

Auswirkungen des synergistischen Effekts der Kombination von Sildenafil und Imatinib auf den SMAD-Signalweg bei pulmonaler Hypertonie

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

des Fachbereichs Biologie und Chemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Dipl. Biol. Joachim Berk

aus Gießen

Gießen, 2014

Mit Genehmigung des Fachbereiches Biologie

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Holger Zorn

Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmitteltechnologie, FB 08

Justus-Liebig-Universität Gießen

Heinrich-Buff-Ring 58, 35392 Gießen

Erstgutachter: Prof. Dr. Adriaan Dorresteyn

Institut für Allgemeine Zoologie und Entwicklungsbiologie

Justus-Liebig-Universität Gießen

Stephanstr. 24, 35390 Gießen

Zweitgutachter: Prof. Dr. Ralph Schermuly

Exzellenzcluster Kardiopulmonales System (ECCPS)

Justus-Liebig-Universität Gießen

Aulweg 130, 35392 Gießen

Tag der Disputation: Dienstag, der 17.02.2015

Die vorliegende Arbeit wurde am Exzellenzcluster Kardiopulmonales System des Lungenzentrums der Justus-Liebig-Universität Gießen (UGMLC, University of Giessen and Marburg Lung Center) und dem Zentrum für Innere Medizin – Medizinische Klinik II in der Zeit von April 2009 bis Dezember 2013 unter der Leitung von Prof. Dr. rer. nat. Ralph Schermuly angefertigt, unter dessen Betreuung diese Arbeit entstand.

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten. Alle Versuche außer den Ergebnissen aus Abschnitt 4.3.1 und 4.3.3 wurden von mir selbst durchgeführt. Die in den beiden genannten Abschnitten beschriebenen Versuche wurden aus technischen Gründen von Mitgliedern der AG Schermuly erarbeitet und von mir ausgewertet.

Joachim Berk

Inhaltsverzeichnis

1.	Abkürzungsverzeichnis	IX
2.	Einleitung.....	2
2.1	Atmungsorgane und Blutkreislauf.....	2
2.1.1	Aufbau der Säugerlunge	2
2.1.2	Aufgaben und Funktion der Säugerlunge.....	4
2.1.3	Der Blutkreislauf.....	4
2.1.4	Aufbau und Funktion der Blut- und Kapillargefäße.....	5
2.2	Pulmonale Hypertonie.....	7
2.2.1	Definition	7
2.2.2	Klassifikation.....	7
2.2.2.1	Einleitung zur Idiopathischen pulmonal-arteriellen Hypertonie.....	8
2.2.3	Pathophysiologie	8
2.2.4	Vaskuläres Remodeling	9
2.2.4.1	Ursachen des vaskulären Remodelings	11
2.2.5	Gegenwärtige Therapie der pulmonalen Hypertonie	11
2.2.5.1	Prostanoide	11
2.2.5.2	Endothelinrezeptor-Antagonisten (ERAs)	12
2.2.5.3	Phosphodiesterase 5-Inhibitoren und Stimulatoren der löslichen Guanylatzyklase	12
	Taladafil	13
	Sildenafil	13
	Riociguat.....	13
2.2.5.4	Kombinationstherapien.....	13
2.2.5.5	Mögliche zukünftige Therapien.....	14
	Imatinib	14
2.3	Studienobjekte	15
2.3.1	HPASMCs - Primärzellen in der Forschung.....	15
2.3.2	Das MCT-Rattenmodell	15

2.4	Der Transforming Growth Factor β	16
2.5	Der BMP-/SMAD- Signalweg	17
2.5.1.	Die BMP Ligandenfamilie	17
2.5.2.	Extrazelluläre Regulation von BMP Liganden.....	18
2.5.3.	BMP Rezeptoren.....	18
2.5.4.	BMP Corezeptoren	19
2.5.5.	SMAD Signaling.....	20
2.6	Stickstoffmonoxid, die Phosphodiesterase 5 und Sildenafil.....	21
2.6.1	Die Phosphodiesterase 5	21
2.6.2	NO-abhängige cGMP Synthese durch sGC	21
2.6.3	Sildenafil	22
2.7	PDGF, der PDGF-Rezeptor und Imatinib.....	23
2.7.1	PDGF und der PDGF-Rezeptor	23
2.7.2	Der PDGF-Signalweg.....	24
2.7.3	Der Kinaseinhibitor Imatinib.....	25
2.8	Ziel dieser Arbeit	26
3.	Material und Methoden	27
3.1	Material	27
3.1.1	Humane pulmonal-arterielle glatte Muskelzellen (hPASMCs)	27
3.1.2	Zellkulturmedien und Substanzen.....	27
3.1.3	Gewebeproben aus isolierten Rattenherzen und -lungen	28
3.1.4	Chemikalien, Puffer und Lösungen.....	29
3.1.4.1	Western Blot und Proteinisolation.....	29
3.1.4.2	RNA- Isolation, cDNA-Synthese und PCR.....	32
3.1.4.3	Proliferationsassay	33
3.1.4.4	Histologische Präparation und Färbungen	33
3.1.5	Verbrauchsmaterial	34
3.1.5.1	Generelles Verbrauchsmaterial.....	34

3.1.5.2	Verbrauchsmaterial für Proteinisolation und Western Blot	35
3.1.5.3	Verbrauchsmaterial für RNA-Isolation, cDNA Synthese und Real-Time PCR	36
3.1.5.4	Verbrauchsmaterial für den Proliferationsassay	36
3.1.6	Antikörper	37
3.1.7	Primer	38
3.1.8	Laborgeräte	39
3.1.9	Verwendete Software	40
3.2	Methoden	41
3.2.1	Kultivierung von humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASMC)	41
3.2.2	Splitten der Zellen	41
3.2.3	Stimulation der Zellen	41
3.2.4	Western Blot	42
3.2.4.1	Vorbereitung der Proben	42
3.2.4.2	Gelelektrophorese, Blotting und Antikörperhybridisierung	42
3.2.4.3	Stripping	43
3.2.5	PCR, Primer Designing und RNA-Isolation	44
3.2.5.1	Primer designing	44
3.2.5.2	Isolation von Ribonukleinsäuren (RNA)	45
3.2.5.3	cDNA Synthese	46
3.2.5.4	Real-Time PCR	46
3.2.6	Proliferationsassay (Thymidininkorporationsassay)	46
3.2.7	Migrations- „Scratch“ Assay	47
3.2.8	Histologische Färbungen	48
4.	Ergebnisse	49
4.1	Direkter Einfluss von Sildenafil und Imatinib auf die Zellteilung von HPASMCs	49
4.1.1	Effekt von Sildenafil und Imatinib auf die Zellproliferation von HPASMCs	49
4.1.2	Die Bestimmung des Wirkungswegs von Sildenafil	50
4.1.3	Nachweis des synergistischen Effekts von Sildenafil und Imatinib auf Proteinebene über relevante Zellzyklusmarker	52

4.2	Auswirkungen der Kombination von Sildenafil und Imatinib auf humane, pulmonalarterielle Muskelzellen.....	54
4.2.1	Einfluss der Kombination von Sildenafil und Imatinib auf Proteinphosphorylierung von SMADs und assoziierten Kinasen	54
4.2.2	Einfluss der Behandlung mit BMP4 auf die Zellproliferation	59
4.2.3	Analyse des Einflusses von Sildenafil und Imatinib auf die RNA-Ebene des SMAD-Signalweges	61
4.2.4	Auswirkungen der Behandlung mit Sildenafil und/oder Imatinib, sowie der Stimulation des SMAD-Signalweges auf die Zellmotilität pulmonal-arterieller Muskelzellen	65
4.3	Physiologische Auswirkungen der Kombination von Sildenafil und Imatinib im MCT-Rattenmodell.....	67
4.3.1	Der Einfluss einer Kombinationstherapie auf den rechtsventrikulären, arteriellen Druck, den Gefäßwiderstandsindex und die Rechtsherzhypertrophie in der Ratte	68
4.3.2	Molekulare Auswirkungen einer Sildenafil-Imatinib-Kombinationstherapie auf das Rattenherz	70
4.3.3	Einfluß der Behandlung von Sildenafil auf den BMP-Signalweg in der Rattenlunge	72
5.	Diskussion.....	76
5.1.	Sildenafil	76
5.1.1.	Sildenafil hemmt die Zellteilungsrate pulmonal-arterieller glatter Muskelzellen durch Stimulation der PKG	77
5.1.2.	Sildenafil beeinflusst den Zellzyklus durch Regulation von Cyclin D1 und p21.....	78
5.1.3.	Die Wirkung von Sildenafil auf pulmonalarterielle Muskelzellen	79
5.1.4.	Eine Behandlung mit Sildenafil wirkt sich positiv auf Kreislauf und rechten Ventrikel aus und verbessert den Zustand des pulmonalarteriellen Gefäßwandaufbaus	80
5.1.5.	Zusammenfassung Sildenafil	82
5.2.	Imatinib	83
5.2.1.	Imatinib hemmt die Proliferation pulmonal-arterieller glatter Muskelzellen	84
5.2.2.	Einfluß von Imatinib auf die Proteinphosphorylierung proliferationsassoziiierter Kinasen, sowie auf die mRNA-Expression und Zellmotilität.....	84
5.2.3.	Imatinib wirkt im MCT Rattenmodell primär auf molekularer Ebene und in pulmonalarteriellen Gefäßen	85

5.2.4.	Zusammenfassung Imatinib	86
5.3	Die Kombination von Sildenafil und Imatinib.....	87
5.3.1	Sildenafil und Imatinib hemmen synergistisch die Proliferation von humanen PASMCs, direkte Stimulation mit BMP4 führt ebenfalls zu einer Reduktion der Zellteilungsrate.....	88
5.3.2	Die Kombinationsbehandlung mit Sildenafil und Imatinib aktiviert den SMAD-Signalweg auf Proteinebene und hemmt Proliferationsfördernde Kinasen	88
5.3.3	Die Kombination von Sildenafil und Imatinib verbessert signifikant das Krankheitsbild der PH im MCT-Rattenmodell	91
5.3.4	Zusammenfassung der Auswirkungen einer Kombinationstherapie mit Sildenafil und Imatinib	92
5.4	Fazit	94
5.5	Aussicht	95
6.	Zusammenfassung.....	96
7.	Summary.....	98
8.	Abbildungsverzeichnis.....	100
9.	Tabellenverzeichnis	106
10.	Literaturverzeichnis.....	107
11.	Index.....	130
12.	Danksagung	132

1. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
±	Plus/Minus
≥	Größer oder gleich
≤	Kleiner oder gleich
Δ	Delta (Unterschied)
α-	(bei Antikörpern) gegen-/anti-
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
6-MWD	sechs-Minuten-Gehtest (six minute walk distance)
8-Br-cGMP	8-Bromo-cyclisches Guanosinmonophosphat
8-pCPT-cGMP	8- (4- Chlorophenylthio)guanosine- 3', 5'- cyclic monophosphate
ACVR-2A	Activinrezeptor Typ 2A
ACVR-2B	Activinrezeptor Typ 2B
AIDS	erworbenes Immundefektsyndrom (Acquired immune deficiency syndrome)
ALK	Aktivinrezeptorartige Kinase (Activin receptor like kinase)
ANP	atriales Natriuretisches Peptid
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BH4	Tetrahydrobiopterin
BMP(s)	Knochenmorphogenetische(s) Protein(e) (bone morphogenetic protein(s))
BMPR	Knochenmorphogenetischer Rezeptor (Bone-morphogenetic-protein-receptor)
BSA	bovines Serumalbumin

ca.	Circa
Ca ²⁺	Calciumionen
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGKI	cGMP abhängige Kinase I (cGMP dependant kinase I)
Cl	Chlor
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung (chronic obstructive pulmonary disease)
CTEPH	chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie
d	Tag
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
dNTP(s)	Desoxynukleotidtriphosphat(e)
DPBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (Dulbecco's phosphate buffered saline)
Dpp	Decapentaplegic (entspr. BMP bei Drosophila)
EC(s)	Epithelzelle(n) (epithelial cell(s))
EDTA	Ethylen-diamin-Tetraacetat
EGF	Epidermal growth factor
EMA	European Medicines Agency
entspr.	entspricht/entsprechend
ERA(s)	Endothelinrezeptor-Antagonist(en)
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinasen
ET-1	Endothelin-1

ETRA	Endothelin Rezeptor A
ETRB	Endothelin Rezeptor B
FCS (=FBS)	fötales Kälberserum
FDA	US Food and Drug Administration
FGF	Fibroblastenwachstumsfaktor (fibroblast growth factor)
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDF	Wachstums- und Differenzierungsfaktor (growth and differentiation factor)
GDNF	glial cell line-delivered neurothrophic factor
GMP	Guanosinmonophosphat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H ₂ O	Wasser (Dihydrogenmonoxid)
HBSS	Hank's balanced salt solution
HMBS	Hydroxymethylbilan-Synthase (=PBGD)
HPAH	Hereditäre (Familiäre) pulmonal-arterielle Hypertonie
hPASMC(s)	menschliche (human) pulmonal-arterielle glatte Muskelzelle(n)
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
ID	Inhibitor des DNA-bindenden Proteins (inhibitor of DNA binding protein)
IPAH	idiopathische pulmonal-arterielle Hypertonie
I-SMAD(s)	inhibitorische(s) SMAD(s)
i. v.	intravenös
kg	Kilogramm
kDa	kiloDalton

M	molar
m ²	Quadratmeter (cm ² = Quadratzentimeter)
MAP-Kinase	Mitogen activated protein kinase (MAPK)
MCT	Monocrotalin
MetOH	Methanol
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
mg	Milligramm
MIS	Myeloid inhibitory siglec
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthasen (eNOS = endothelial NOS, iNOS = Inducible NOS)
O ₂	Sauerstoff
°C	Grad Celsius
PAPm	pulmonal-arterieller Mitteldruck
PA	Pulmonalarterie(n)
PAH	pulmonalarterielle Hypertonie
PASMC(s)	pulmonal-arterielle glatte Muskelzelle(n) (pulmonal arterial smooth muscle cell(s))
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered salt saline)
PBGD	Porphobilinogen-Deaminase (=HMBS)
PC	Personal Computer

PCH	pulmonale kapilläre Hämangiomatose
PDE(s)	Phosphodiesterase(n)
PDGF	Platelet derived growth factor
PDGF-A	Platelet derived growth factor A (Ligand)
PDGF-B	Platelet derived growth factor B (Ligand)
PDGFR- α	Platelet derived growth factor Rezeptor alpha
PDGFR- β	Platelet derived growth factor Rezeptor beta
PGI ₂	Prostacyclin
pGC	partikuläre (membranständige) Guanylatcyclase
PH	pulmonale Hypertonie
PI3-K	Phosphoinositid 3-kinase
PKG	cGMP-abhängige Proteinkinase
PPAR γ	peroxisome proliferator-activated receptor- γ
PPH	primäre pulmonale Hypertonie
PVOD	Pulmonale Venookklusive Erkrankung
PVRI	Pulmonalvaskulärer Widerstandsindex
R-SMAD(s)	Rezeptorassoziierte(s) SMAD(s)
RT PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction)
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
RV	rechter Ventrikel
RV/LV+S	Ratio aus rechtem Ventrikel zu linkem Ventrikel plus Septum
RVP	right ventricular pressure (rechtsventrikulärer Druck)
RVSP	rechtsventrikulär systolischer Druck, right ventricular systolic pressure
s.	siehe

SBE	SMAD bindende Elemente
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SAP	systemisch arterieller Druck, systemic arterial pressure
SD	standard deviation (Standardabweichung)
SEM	standard error mean (Standardfehler)
sGC	lösliche Guanylatzyklase (soluble guanylate cyclase)
SMA	glattmuskuläres Aktin (smooth muscle actin)
SMAD	MAD = Mothers against decapentaplegic gene; Sma = small body size protein
SmBm	Basalmedium für glatte Muskelzellen (smooth muscle cell basal medium)
SMC(s)	siehe PASMC
SmGm	Vollmedium für glatte Muskelzellen (smooth muscle cell growth media)
SMURF	SMAD Ubiquitin Ligase (SMAD ubiquitylation regulatory factor)
Sog.	sogenannt (-e, -er, -es)
SSV	Simian sarcoma Virus
SVRI	Systemisch-vaskulärer Widerstandsindex
TBS	TRIS-gepufferte Salzlösung
TBST	TRIS-gepufferte Salzlösung mit TWEEN
TD	Tail-Domäne
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
TGF- α/β	Transforming growth factor alpha/beta
T _h	Hybridisierungstemperatur
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
Trb3	Tribbles-artiges Protein 3
TRIS (TRIZMA)	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

TWEEN 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
VEGF	vascular endothelial growth factor
Vg	vegetalising factor (entspr. TGF- β bei Xenopus)
Vgr	vegetalising factor related gene
vWF	von Willebrand Faktor (Faktor VIII)
z. B.	zum Beispiel

2. Einleitung

2.1 Atmungsorgane und Blutkreislauf

Der oxidative Zellstoffwechsel erfordert einen ständigen Gasaustausch zwischen Organismus und Umgebung. Der Hauptvorrat dieses lebensnotwendigen molekularen Sauerstoffs ist in unserer Atmosphäre zu finden, die einen Sauerstoffgehalt von 21% besitzt, aber auch Gewässer enthalten geringe Mengen an gelöstem Sauerstoff. Der Bereich eines Tieres, der für die Aufnahme des Sauerstoffs zuständig ist, wird als respiratorische Oberfläche bezeichnet. Während kleinere Organismen, wie beispielsweise Protozoen oder Plathelminthen ein ausreichend großes Oberflächen/Volumen-Verhältnis (z. B. *Paramecium* $1000 \text{ cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ im Vergleich zum Menschen $0,5 \text{ cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) aufweisen, ist es bei größeren Lebewesen notwendig, ein spezielles respiratorisches Epithel auszubilden, das die Größe der nicht-respiratorischen Körperoberfläche um ein Vielfaches übersteigt. So benötigt ein Organismus mit einer Körperoberfläche von 2 m^2 eine respiratorische Alveolarfläche von ca. 100 m^2 . In diesem respiratorischen Organ findet die „äußere Atmung“ statt. Unter dem Begriff innere Atmung hingegen versteht man den Gasaustausch zwischen Blut und Gewebe. Bei den meisten Wasserorganismen haben sich Kiemen als respiratorisches Organ durchgesetzt, bei Insekten sind es Tracheen, während die meisten Landwirbeltiere Lungen ausgebildet haben. Kiemen fungieren als eine Vergrößerung der Körperoberfläche, die kontinuierlich vom Atemmedium, dem Wasser, umspült wird. Tracheen sind ein röhrenförmiges Atmungsorgan, welches einen Großteil des gesamten Organismus durchzieht. Die Lunge der Landvertebraten ist ein sackförmiges respiratorisches Organ, welches in der Thoraxhöhle zu finden ist. (1), (2)

2.1.1 Aufbau der Säugerlunge

In der Embryogenese entwickelt sich die Vorderlunge als Aussackung des Vorderdarms. Folgt man dem Weg der eingeatmeten Luft durch Mund und Nase, passiert die Luft als nächstes Pharynx (Rachen oder Schlund(kopf)), Ösophagus (Speiseröhre) und Larynx (Kehlkopf), um anschließend in die Trachea (Lufttröhre) zu gelangen. Die Trachea teilt sich in die beiden Bronchien, diese wiederum spalten sich wieder und wieder in immer kleiner werdende Bronchiolen auf. Von den terminalen Bronchiolen, die in die respiratorischen Bronchiolen übergehen, gelangt die Luft in die jeweils zwei Alveolargänge und schließlich in die blind endenden Alveolen. Die Alveolen sind von einem Netz aus Kapillaren umschlossen, die sauerstoffarmes Blut aus der rechten Herzkammer zur Lunge hin- und das sauerstoffreiche, kohlendioxidarme Blut zur linken Herzhälfte zurück führen (siehe Abbildung 2-1).

Die Lunge selbst separiert sich in fünf Loben, davon drei im rechten und zwei im linken Lungenflügel. Beide Lungenflügel sind von der Pleura umschlossen. Diese ist eine doppelwandige Hülle, deren inneres Blatt fest an der Lunge haftet, während das äußere Blatt fest mit der Wand der Brusthöhle verwachsen ist. Durch die zwischen beiden Blättern herrschende Adhäsionskraft können sich die Membranen gegeneinander verschieben, ohne daß die Lunge kollabiert. Nach unten wird die Lunge durch das Zwerchfell vom Bauchraum abgegrenzt. (1), (2)

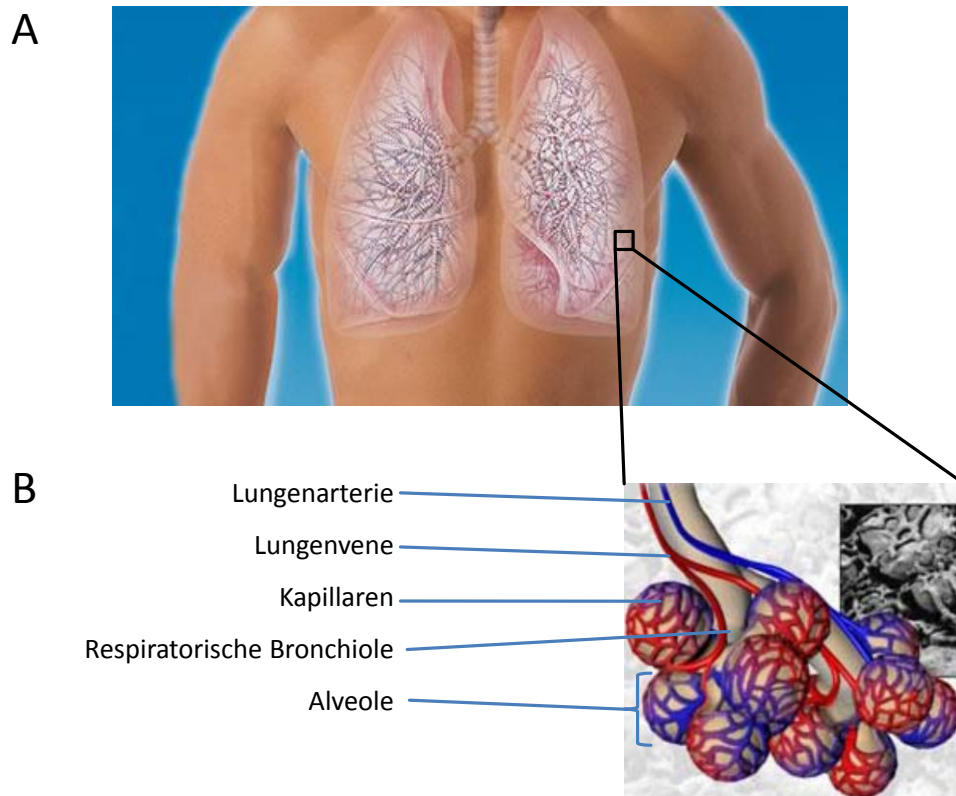


Abbildung 2-1: Aufbau der menschlichen Lunge. Die Trachea gabelt sich in die beiden Bronchien, die sich in den beiden Lungenflügeln immer weiter verzweigen (A) und über die Bronchiolen schließlich in die Alveolen münden. Jede Alveole ist mit einem Netz feiner Kapillaren umschlossen, so daß der Gasaustausch effizient stattfinden kann (B). (Verändert nach <http://www.uni-Duesseldorf.de/MathNat/Biologie/Didaktik/Atmung/start/struktur/ov/ovat/ovatmen.html> und Wort & Bild Verlag Konradshöhe GmbH & Co. KG, Simone Herzner / www.apotheken-umschau.de; 13.09.2005, aktualisiert am 04.09.2013.)

2.1.2 Aufgaben und Funktion der Säugerlunge

Die Hauptaufgaben der Säugerlunge sind die Aufnahme von Sauerstoff (O_2) ins Blut (Oxygenierung) und die Abgabe von Kohlendioxid (CO_2) aus dem Blut an die Atmosphäre. Eine weitere wichtige Aufgabe der Lunge ist die Teilnahme an der Säure-Base-Regulation durch ihre Fähigkeit zur CO_2 -Abgabe. Diese drei Aufgaben können von der Lunge nur erfüllt werden, wenn alle Lungenabschnitte ungehindert mit Luft versorgt (ventiliert) werden, die Gase ungehindert in das bzw. aus dem Blutgefäßsystem diffundieren können und alle Lungenabschnitte ausreichend mit Blut versorgt sind.

(3)

2.1.3 Der Blutkreislauf

Der menschliche Körper besitzt zwei Kreisläufe. Der große Kreislauf wird auch Körperkreislauf genannt, ist mit einem durchschnittlichen Druck von 120 mmHg (Systole) bzw. 80 mmHg (Diastole) als Hochdrucksystem zu verstehen und versorgt alle Organe mit Sauerstoff, Nährstoffen und entsorgt Gift- und Abfallstoffe. Der kleine Blutkreislauf hingegen wird auch als Lungenkreislauf bezeichnet. Das Blut, welches hier über die obere und untere Hohlvene in den rechten Vorhof und die rechte Herzkammer gelangt, wird von dort über die Lungenarterie in die Lunge gepumpt. Die sich hier in feine Kapillaren verzweigenden Blutgefäße bringen so das Blut möglichst nah an die respiratorische Oberfläche, um den passiven Gasaustausch zu ermöglichen. Das von dort mit Sauerstoff angereicherte Blut fließt dann über die Lungenvene in den linken Vorhof, die linke Herzkammer und von dort über die Aorta schließlich wieder in jedes einzelne Organ des Körpers (siehe Abbildung 2-2). Der kleine Blutkreislauf ist mit einem Druck von durchschnittlich 14mmHg ein Niederdrucksystem.

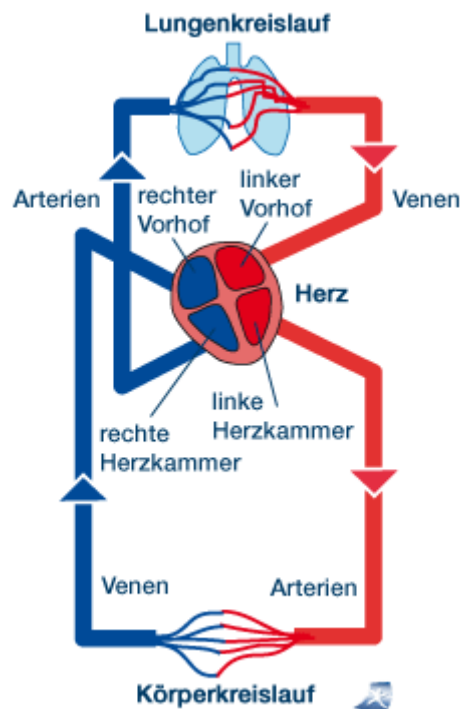


Abbildung 2-2: Schematische Übersicht über den großen Blutkreislauf (unten) und den Lungenkreislauf (oben). Gefäße mit sauerstoffreichem Blut sind in rot dargestellt, die mit sauerstoffarmen Blut in Blau. Vom rechten Vorhof gelangt das sauerstoffarme Blut in die Lungenarterie und schließlich zur Lunge, wo der Gasaustausch stattfindet. Von dort gelangt das O₂-angereicherte Blut über die Lungenvene und den linken Vorhof in die linke Herzkammer, die es über die Aorta in den Körperkreislauf transportiert. Nachdem das Blut in zahlreichen Kapillaren seinen Sauerstoff abgegeben hat, wird es in Venen gesammelt und gelangt schließlich über die Obere und untere Hohlvene zurück in den rechten Vorhof (Quelle: Onmeda.de, Dr. med. Fabian Weiland, Stand 15.8.2012)

2.1.4 Aufbau und Funktion der Blut- und Kapillargefäße

Blutgefäße lassen sich in zwei Hauptgruppen unterteilen: Arterien und Venen. Arterien führen das Blut von der rechten Herzkammer zur Lunge um dort Gasaustausch zu ermöglichen und von der linken Herzkammer zu sämtlichen anderen Organen, um die Organe mit Nährstoffen zu versorgen. Venen sammeln das sauerstoffarme (oder im Fall der Lungenvene sauerstoffreiche) Blut und führen es zurück zum Herzen. Im Folgenden soll auf den Aufbau von Arterien, Arteriolen und Kapillargefäßen eingegangen werden.

Die Wände von Arterien enthalten drei Auskleidungen. Von innen nach außen gesehen kommt zunächst die *Tunica interna* (oder *Tunica intima*), dann die *Tunica media* und schließlich die *Tunica externa*. Die *Tunica interna* besteht aus einem einfachen, plattenförmigen Epithel; dem sog. Endothel, einer Basalmembran und der *lamina elastica interna*. Das Endothel ist eine durchgehende Zellschicht, die das gesamte Innere des Herz-Kreislaufsystems auskleidet und im Normalfall die einzige Zellschicht ist, die direkten Kontakt zum Blut hat.

Die *Tunica media* ist die dickste der drei Schichten, aus denen Arterien aufgebaut sind. Sie besteht aus elastischen Fasern und glatten Muskelfasern, die eine Art Schlauch um die *Tunica interna* bilden. Desweiteren besitzt die *Tunica media* auch eine Lamina, die *Lamina elastica externa* aus elastischem Gewebe. Die *Tunica externa* ist hauptsächlich aus elastischen Fasern und Kollagenfasern aufgebaut (siehe Abbildung 2-3).

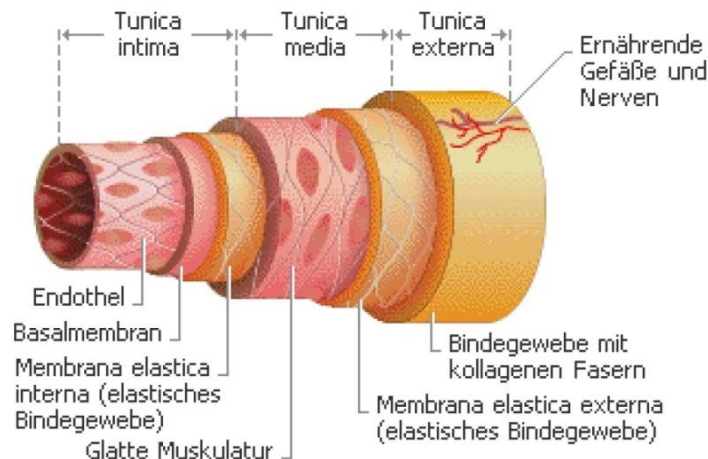


Abbildung 2-3: Aufbau der Arterienwand. Endothel, Basalmembran Membrana/Lamina elastica interna bilden die *Tunica intima*, Arterielle glatte Muskelzellen und die Membrana/Lamina elastica externa bilden die *Tunica media*. Die *Tunica externa* besteht aus Bindegewebe mit kollagenen Fasern. (Fr. E. Joubert-Huebner, 25.03.2009, www.Kardiotechnik.org)

Über die glatten Muskelzellen der *Tunica media* verteilt sind sympathische Neurone des vegetativen Nervensystems zu finden. Bei sympathischer Erregung können so die glatten Muskelzellen zur Kontraktion angeregt werden, wodurch der Durchmesser der jeweiligen Arterie verkleinert wird. Diesen Vorgang nennt man Vasokonstriktion. Das Gegenteil der Vasokonstriktion ist die Vasodilatation, die einerseits durch das Abnehmen der sympathischen Erregung zustande kommt, aber auch durch Chemikalien wie Stickstoffmonoxid (NO) oder Milchsäure verursacht werden kann.

Arteriolen sind kleinere Blutgefäße mit einem Durchmesser von 10-100 µm, deren Aufgabe es ist, das Blut auf die einzelnen Kapillaren zu verteilen. Eine wichtige Funktion der Arteriolen ist die Regulation des Blutflusses, indem sie den Widerstand steigern oder senken, der dem Blutfluss entgegengesetzt wird. Der Widerstand wird erhöht, indem der Durchmesser der Arteriolen durch Stimulation der in deren Wand befindlichen glatten Muskelzellen verkleinert wird. Die Folge ist, daß sich der Blutfluss in die Kapillaren, welche der jeweiligen Arteriole folgen, verringert. Durch eine Vasodilatation hingegen wird die Durchblutung der nachfolgenden Kapillaren verstärkt.

Kapillargefäße sind Blutgefäße mit einem Durchmesser von 4-10 µm, die Arteriolen mit Venolen verbinden. Den Blutfluss von den Arterien über Arteriolen, Kapillaren, Venolen zu den Venen bezeichnet man als Mikrozirkulation. Die Aufgabe der Kapillaren ist der Stoffaustausch mit dem umliegenden Gewebe. Hierfür sind die Kapillarwände effizient gestaltet. Sie bestehen lediglich aus einer Schicht von Endothelzellen (ECs) und einer Basalmembran. Die Tunica media oder Tunica externa fehlen vollständig. Kapillaren bilden ausgedehnte Netzwerke, um so einen effizienten Stoffaustausch zu ermöglichen. Der Austausch von Sauerstoff und Kohlendioxid zwischen Lungenkapillaren und Alveolen findet lediglich durch passive Diffusion entlang des jeweiligen Konzentrationsgradienten statt.(4)

2.2 Pulmonale Hypertonie

Pulmonale Hypertonie (PH) wurde erstmals 1891 durch den deutschen Arzt und klinischen Wissenschaftler Ernst von Romberg beschrieben (5). Heute sind ca. 100 Millionen Menschen weltweit daran erkrankt.

2.2.1 Definition

Der Normwert für den pulmonal-arteriellen Mitteldruck (PAPm) beträgt 14 ± 3 mmHg, wobei die Obergrenze mit 20mmHg festgelegt wurde. Eine pulmonale Hypertonie liegt ab einem PAPm von ≥ 25 mmHg vor. Dazwischen befindet sich ein Graubereich, der nicht eindeutig definiert ist. Zusätzlich gab es bis vor einigen Jahren noch das Kriterium, daß eine pulmonale Hypertonie vorliegt, wenn unter Belastung der PAPm auf über 30 mmHg ansteigt. Dieses wurde jedoch verworfen, da auch bei gesunden Menschen höhere Werte vor allem in höherem Alter physiologisch möglich sind. (6)

2.2.2 Klassifikation

Auf dem „5th World Symposium on pulmonary Hypertension“ in Nizza wurde die Klassifizierung der pulmonalen Hypertonie überarbeitet und den neuesten Erkenntnissen angepasst (7).

Aktualisierte klinische Klassifikation der pulmonalen Hypertonie (Nice, 2013):

1. Pulmonal arterielle Hypertonie (PAH)
 - 1.1 Idiopathische PAH
 - 1.2 Hereditäre PAH (Familiäre PAH): BMPR2-Mutationen, ALK1-Mutationen, Endoglin-Mutationen, SMAD9-Mutationen, CAV1-Mutationen, KCNK3-Mutationen, unbekannte Mutationen
 - 1.3 Durch Medikamente/Toxine verursachte PAH
 - 1.4 Assoziiert mit identifizierten Erkrankungen (Bindegewbserkrankungen, HIV-Infektion, Portaler Hypertension, Angeborenen Herzfehlern, Schistosomiasis, Chronisch hämolytischer Anämie).
- 1'. Pulmonale veno-okklusive Erkrankung (PVOD) und/oder pulmonale kapilläre Hämangiomatose (PCH)
- 1''. Persistierende pulmonale Hypertonie des Neugeborenen (PPHN)
2. Pulmonale Hypertonie infolge Linksherzerkrankungen
 - 2.1 Linksventrikuläre systolische Dysfunktion
 - 2.2 Linksventrikuläre diastolische Dysfunktion
 - 2.3 Valvuläre Erkrankungen
 - 2.4 Angeborene/erworbene Obstruktion des linken Herzens Zu- und Abflusstrakts und angeborene Kardiomyopathien
3. Pulmonale Hypertonie infolge Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie
 - 3.1 Chronisch obstruktive Lungenerkrankungen
 - 3.2 Interstitielle Lungenkrankheiten
 - 3.3 Andere Lungenerkrankungen mit gemischt restriktiv/obstruktivem Muster
 - 3.4 Schlafbezogene Atemstörungen
 - 3.5 Alveoläre Hypoventilationssyndrome
 - 3.6 Chronische Exposition in großer Höhe
 - 3.7 Fehlentwicklungen der Lunge
4. Chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie (CTEPH)
5. Pulmonale Hypertonie mit unklarem oder multifaktorellem Mechanismus

2.2.2.1 Einleitung zur Idiopathischen pulmonal-arteriellen Hypertonie

Pulmonal arterielle Hypertonie (PAH), definiert auf dem 5th World Symposium 2013 in Nizza als Pulmonale Hypertonie der Klasse I, ist eine Störung des pulmonal-vaskulären Systems. Charakterisiert ist PAH, durch erhöhten vaskulären Widerstand, erhöhten pulmonalarteriellen Druck und spezifische histologische Veränderungen (8). Trotz ähnlicher Pathophysiologie und Symptome unterscheidet sich die idiopathische pulmonale Hypertonie von den anderen Gruppen der PAH dadurch, daß ihr keine erkennbare Ursache zu Grunde liegt.

2.2.3 Pathophysiologie

Die Symptome von Patienten können variieren, jedoch tritt bei den meisten Patienten eine Dyspnoe auf. Besonders charakteristisch ist ebenso eine Hypertrophie des rechten Ventrikels, also eine Vergrößerung der rechten Herzhälfte als Antwort auf die erhöhte Nachlast (bezeichnet wird dies als *Cor pulmonale*) (9). Weitere Symptome sind in späteren Stadien Schmerzen in der Brust, sowie Synkope (kurzzeitige Ohnmacht). Bei Patienten können die Symptome einer Rechtsherzinsuffizienz wie periphere Ödeme oder Aszites (Flüssigkeitsansammlungen in der freien Bauchhöhle) auftreten.

Auch kann PH als ein Zufallsbefund während eines Echokardiogramms, das aus anderen Gründen durchgeführt wurde, entdeckt werden (10). Sofern die Hypertonie unbehandelt bleibt, haben Patienten eine mittlere Lebenserwartung von weniger als drei Jahren ab Diagnose (11).

Möglichkeiten zur Diagnose von PH sind die Echokardiographie, durch die auf nicht-invasivem Weg Druck und Fluss gemessen wird und die Rechtsherzkatheterisierung. Letztere ist eine minimalinvasive Methode, die bereits seit den 1860er Jahren in der Medizin verwendet wird (12) und gilt bis heute als Goldstandard in der Diagnose von PH.

Die pathologische Diagnose des pulmonal-vaskulären Remodelings ist abhängig von der histologischen Bewertung der zellulären Zusammensetzung der pulmonal-vaskulären „Wände“, die wenn sie abnormal ist, als „pulmonal-vaskuläre Läsionen“ bezeichnet wird (10).

2.2.4 Vaskuläres Remodeling

Unter pulmonalvaskulärem Remodeling versteht man Modifikationen im Aufbau der Wände von Pulmonalarterien. Bei allen Arten von PH findet vaskuläres Remodeling v.a. in Widerstandsgefäßen, deren Aufgabe es ist, die Durchblutung bestimmter Lungenabschnitte zu regulieren, statt (13), (14). In diesen Vorgang sind viele vaskuläre Zelltypen involviert, betroffen sind sämtliche Schichten der Gefäßwand (15). Im Folgenden soll auf zwei der wichtigsten beteiligten Zelltypen eingegangen werden, das Endothel und die pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASMCs). Das Gleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose in den dort vorhandenen PASMCs, welches normalerweise den Erhalt und die Funktion der Blutgefäße sicherstellen soll, ist verschoben. Es findet im Verhältnis zu viel Zellproliferation und zu wenig Apoptose statt (16), (17). Gesteuert wird dieser Vorgang durch Endothelzellen (ECs), die die PASMCs durch die Bildung von Vasodilatoren und Konstriktoren beeinflussen (18). Auch findet hier endotheliale Zellproliferation und Deposition zusätzlicher Matrixkomponenten statt (19). Das Resultat dieser verstärkten Zellproliferation ist eine Verdickung der *Tunica media*, sowie eine verstärkte Migration von PASMCs in kleinere, normalerweise nicht muskularisierte Arteriolen (20). Letztere wird als *de novo* Muskularisierung bezeichnet (21). Zusammengefasst laufen während des vaskulären Remodelings zwei Vorgänge parallel ab: Zum einen erfolgt ein Umbau der Gefäßwände, welcher den Innendurchmesser der Gefäße reduziert, wodurch der innere Widerstand steigt und die vasodilatorische Kapazität abnimmt (20). Zum anderen führt die Proliferation zu einem Verlust kleiner, distaler Blutgefäße (17), (20) (siehe Abbildung 2-4). Die Folge dieser beiden Vorgänge ist eine Dezimierung paralleler, vaskulärer Zirkulationswege und ein signifikant erhöhter Gefäßwiderstand (20).

Um den erhöhten pulmonalen Widerstand zu kompensieren, bildet sich eine Hypertrophie des rechten Herzens aus (rechtsventrikuläre Hypertrophie, RVH), was mit einer Komprimierung des linken Ventrikels einhergeht. Späte Folgen des gesteigerten pulmonalen Widerstands sind kontraktile Dysfunktion, Dekompensation und Dilatation, was schließlich zu einem Rechtsherzversagen führt (9).

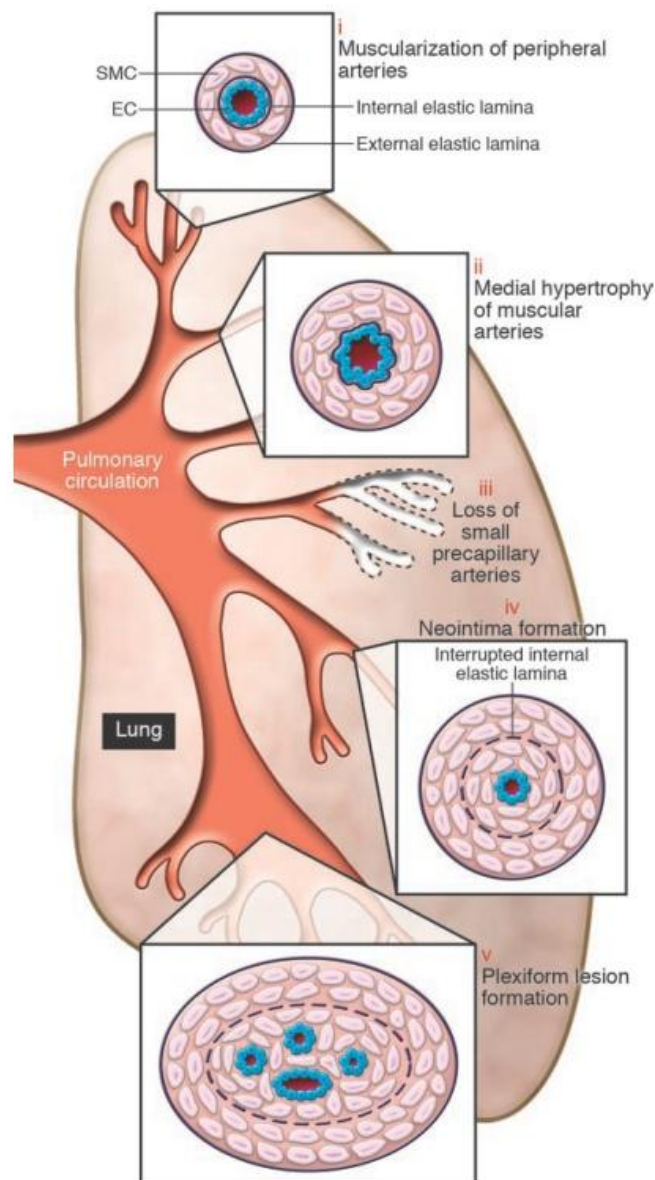


Abbildung 2-4: Schema der pathologischen Abnormalitäten durch vaskuläres Remodeling während der pulmonalen Zirkulation. Muskularisierung peripherer Arterien (i), Mediale Hypertrophie muskularisierter Arterien (ii), Verlust kleiner, präkapillärer Arterien (iii), Neointimaformierung mit Verlust der inneren lamina elastica interna (iv), Formierung plexiformer Läsionen (v). (Rabinovitch, M. 2008) (17).

2.2.4.1 Ursachen des vaskulären Remodelings

Die Pathogenese dieser Veränderungen kann von mehreren Faktoren abhängig gemacht werden, u.a. vom Zusammenspiel genetischer Faktoren und assoziierten Erkrankungen und/oder Triggermechanismen. Vaskuläres Remodeling und somit PH tritt oft als Folge von Lungenfibrose, Virusinfektionen (wie AIDS oder humanes Herpesvirus) oder chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) auf (22), (23). Beispiele für Gene, deren Mutation PH begünstigen, sind der BMPR2- oder ALK1 – Rezeptor (24). Auf diese Gene soll im Abschnitt 2.5.3 genauer eingegangen werden. Auch kann ein Ungleichgewicht zwischen proliferations- oder überlebensfördernden Wachstumsfaktoren (platelet derived growth factor [PDGF] (25), Endothelin (26), (27), transforming growth factor α und β [TGF- α/β] (28) und dem vascular endothelial growth factor [VEGF] (29)), Vasokonstriktoren (Thromboxan (30), 1,5-Hydrotryptamin (31)) und pro-apoptotischen Wachstumsfaktoren oder Botenstoffen (Prostaglandin I_2 /Prostacyclin (30), NO oder zyklischem Guanosinmonophosphat [cGMP] (32), (33)) als Ursache auftreten. Desweiteren können Entzündungen das Entstehen von PH begünstigen, was durch das Vorhandensein von Monozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten in den betroffenen Blutgefäßen nachgewiesen werden kann (34). Parasitäre Infektionen, die eine starke Entzündung hervorrufen, wie beispielsweise Schistosomiasis, können ebenso die Bildung einer PH begünstigen (35). Schließlich kann auch Hypoxie, der Individuen beispielsweise in großer Höhe ausgesetzt sind zu einer PH führen. Bei einer idiopathischen PAH hingegen entwickelt sich die PH ohne vorrangegangene erkennbare Ursache.

2.2.5 Gegenwärtige Therapie der pulmonalen Hypertonie

Forschungen in den letzten Jahren haben das Verständnis der pathologischen Mechanismen von PH verbessert. Obwohl bis heute noch kein Heilmittel gefunden wurde, konnten diverse spezifische therapeutische Mittel entwickelt werden, um das Krankheitsbild zu verbessern (36). Der folgende Abschnitt soll einen kurzen Überblick über die Medikamente und ihre Wirkungsweisen geben.

2.2.5.1 Prostanoid

Das Arachidonsäurederivat Prostacyclin (PGI_2) wird durch Endothelzellen gebildet und ist ein starker systemischer und pulmonaler Vasodilator. Zudem ist es ein Inhibitor der Blutplättchenaggregation, indem es den intrazellulären Spiegel an cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) erhöht (37), (38). Auch spielt es eine wichtige Rolle in antiproliferativen, antithrombotischen, antimitogenen und immunmodulatorischen Vorgängen (33). Prostanoid sind eine Familie von Prostacyclin-Analoga, die intravenös, subkutan oder inhalativ verabreicht werden. In den 80er Jahren wurde das erste

Prostanoid Epoprostenol in PAH erprobt (39). Auf Grund seiner kurzen Halbwertszeit von weniger als 5 min mußte es jedoch über einen zentralen Venenkatheter, der mit einer Infusionspumpe verbunden war, verabreicht werden (36). Diese teure und aufwendige Behandlungsform in Kombination mit Nebenwirkungen wie Kopfschmerzen, Hitzegefühl, Kieferschmerzen und Verdauungsstörungen führten dazu, daß weitere Prostacyclinderivate wie das stabilere, intravenös zu verabreichende Treprostinil, das per Inhalation zu verabreichende Iloprost, sowie weitere spezifische Medikamente entwickelt wurden (36).

2.2.5.2 Endothelinrezeptor-Antagonisten (ERAs)

Endothelin-1 (ET-1) ist ein effizienter Vasokonstriktor und spielt demzufolge eine wichtige Rolle in der Pathogenese von PAH (36). Zusätzlich fördert es die SMC-Proliferation (40) und wurde in erhöhten Mengen im Plasma von PAH-Patienten nachgewiesen (36). Es gibt zwei verschiedene Isoformen des Endothelinrezeptors: den Endothelinrezeptor A (ETRA) und Endothelinrezeptor B (ETRB). Aktivierung des ETRA führt bei SMCs zu Proliferation und Vasokonstriktion, wobei die Aktivierung des ETRB pulmonale Endothelzellen dazu anregt, Prostacyclin und NO abzugeben und an der Entfernung des freigesetzten ET-1 mitzuwirken (36). Bosentan ist ein oral zu verabreichender ETRA- und ETRB- Antagonist, der Studien zu Folge innerhalb von drei Monaten deutliche Verbesserungen in Kondition und Belastbarkeit der Patienten bewirkt (41). Als Weiterentwicklung des Bosentans entstand der duale Endothelinrezeptorantagonist Macitentan. Dieser zeichnet sich im Vergleich zu seinem Vorgänger durch eine verbesserte Rezeptorbindung, sowie höhere Gewebepenetrationsrate aus (42). Ein weiterer Endothelin A-spezifischer Rezeptorantagonist ist Ambrisentan, welcher bereits in einer Pilotstudie (43) und zwei randomisierten klinischen Studien untersucht wurde (44).

2.2.5.3 Phosphodiesterase 5-Inhibitoren und Stimulatoren der löslichen Guanylatzyklase

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein effektives SMC Relaxant, welches seine gefäßerweiternde Wirkung durch die Synthese von cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) entwickelt. Der cGMP Stoffwechsel ist abhängig von einer Reihe Phosphodiesterasen (PDEs) (45), von denen hauptsächlich PDE 3, 4 und 5 in kontraktile Zellen von Pulmonalarterien zu finden sind. Mehrere experimentelle Untersuchungen belegten, daß von diesen drei Phosphodiesterasen PDE5 am häufigsten exprimiert wird. Nachgewiesen werden konnte dies durch den positiven Effekt auf vaskuläres Remodeling und Vasodilatation nach PDE5 Hemmung (46), (21).

Taladafil

Taladafil ist ein PDE5-Inhibitor, der 2009 in Europa und Nordamerika zugelassen wurde. Bei einer Studie konnte bei Tadalafil nach dreimonatiger Behandlung eine Verbesserung im sechs-Minuten-Gehtest (6 minute walk Test, 6-MWD) eine Verbesserung um 33 m im Vergleich zur Placebogruppe erreicht werden (33). Obwohl diese Verbesserung dosierungsspezifisch war, konnte nur mit der höchsten Dosis dieser Studie eine signifikante Verbesserung belegt werden (36).

Sildenafil

Sildenafil ist ein oraler PDE5 Inhiitor, der in Europa seit 2005 für die Behandlung von PAH der Klassen II-III (in den USA ebenso für Klasse IV) eingesetzt wird. Eine Studie mit 278 PH Patienten der Klassen II-III zeigte nach dreimonatiger Behandlung mit Sildenafil (je Gruppe 20 mg, 40 mg und 80 mg) eine um bis zu 50 m verbesserte Strecke im 6-MWD im Verhältnis zur Placebogruppe. Auch konnten in diesem Test signifikante hämodynamische und funktionelle Verbesserungen im Vergleich zur Placebogruppe festgestellt werden (36). Auf die molekularbiologische Wirkungsweise von Sildenafil soll im Abschnitt 2.6 genauer eingegangen werden.

Riociguat

Anders als die PDE5-Inhibitoren sorgt Riociguat nicht für eine Verringerung der cGMP-Degradation. Stattdessen stimuliert es in Synergie mit NO, sowie NO-unabhängig die cGMP-Produktion durch die lösliche Guanylatzyklase, um so die intrazelluläre cGMP-Konzentration zu erhöhen (42), (47). Studien belegten, daß eine Dosis von 3x 2,5mg täglich ausreicht, um positive Ergebnisse in Übungskapazität, Hämodynamik und dem Zeitpunkt bis zur klinischen Verschlechterung des Krankheitsverlaufs zu erzielen (48). Allerdings zeigte eine großangelegte Studie mit über 400 Patienten, daß Riociguat nicht in Kombination mit PDE5-Inhibitoren verwendet werden sollte, da Hypotonie, sowie andere Nebenwirkungen durch diese Kombination auftreten können (49). Riociguat ist in den USA bereits durch die „US Food and Drug Administration“ (FDA) zur Behandlung von PAH und CTEPH zugelassen und unterliegt derzeit der Prüfung durch die „European Medicines Agency“ (EMA), um auch in Europa als Behandlungsmittel eingesetzt werden zu können.

2.2.5.4 Kombinationstherapien

Das Ziel von Kombinationstherapien ist es, Medikamente mit verschiedenen Wirkmechanismen zu kombinieren, um so den größtmöglichen Behandlungserfolg mit minimalen Nebenwirkungen zu erreichen (50). Beispielsweise konnte in einer Studie zu einer Kombinationstherapie mit i.v. Epoprostenol gezeigt werden, daß durch eine zusätzliche Behandlung mit 80 mg Sildenafil (oral, 3x täglich) eine Verbesserung im 6-MWD, sowie den hämodynamischen Parametern im Vergleich zur

ausschließlichen Therapie von Epoprostenol erreicht werden konnte. Auch wurde in dieser Studie eine signifikante Reduktion der Patienten mit verschlechtertem klinischen Zustand, sowie eine Senkung der Mortalitätsrate nachgewiesen (36), (51).

2.2.5.5 Mögliche zukünftige Therapien

Derzeit werden weitere Wirkstoffe untersucht, wie beispielsweise der neue, gewebespezifische, lipophile ET-1 Rezeptorantagonist Macitentan (ACT-064992) (52), oder der hoch selektive Prostacyclin IP Rezeptorantagonist Selexipag (ACT-333679). Letzterer weist eine Halbwertszeit von sechs Stunden auf und kann durch seine Selektivität in PAH eingesetzt werden, um kleinere als auch größere Pulmonalarterien vasodilatorisch positiv zu beeinflussen (36), (53), (54), (55). Ein weiteres Medikament, welches derzeit untersucht wird, ist Riociguat. Anders als die meisten zuvor erwähnten Medikamente ist es jedoch kein Rezeptorantagonist, sondern fördert die Gefäßerweiterung von Pulmonalgefäßen durch direkte Stimulation des Enzyms lösliche Guanylatzyklase (soluble guanylate cyclase, sGC), um so NO-unabhängig die Gefäßerweiterung zu fördern und die sGC für niedrigere endogene NO-Werte zu sensibilisieren (56).

Imatinib

Eines der vielversprechendsten Ziele in der PAH-Forschung ist der „platelet-derived growth factor“ (PDGF). PDGF ist involviert in endothelialer Dysfunktion, sowie der Proliferation und Migration von PSMCs. Daher wird angenommen, daß PDGF ebenso an der Pathogenese der PAH beteiligt ist (36),(25), (57), (58). Der PDGF Rezeptorinhibitor Imatinib (Gleevec) wurde ursprünglich für die Behandlung chronischer Leukämie entwickelt (59), (60). Jedoch zeigte seine Anwendung in einer klinischen Phase II Studie deutliche Verbesserungen in einer ersten 24-wöchigen Doppelblindstudie (Imatinib vs. Placebo); mit 59 Patienten der Klasse II und IV PAH zeigte sich eine signifikante Verbesserung in den hämodynamischen Untersuchungsergebnissen gegenüber der Placebogruppe, insbesondere bei den Patienten, welche unter den schwersten hämodynamischen Beeinträchtigungen litten. Allerdings konnte im 6-MWD keine signifikante Verbesserung (+22 m im Vergleich zur Placebogruppe) festgestellt werden (36), (61). In einer anschließenden Phase III Studie (202 Patienten, 24 Wochen) konnte jedoch neben den hämodynamischen Effekten auch eine signifikante Verbesserung im 6-MWD um 32 m im Vergleich zur Placebogruppe nachgewiesen werden (36), (62).

2.3 Studienobjekte

2.3.1 HPASMCs - Primärzellen in der Forschung

Alle molekularbiologischen Versuche der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe von humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen durchgeführt. Diese Zellen entstammen der *Tunica Media* und sind einer der wichtigsten Ansatzpunkte der wissenschaftlichen Forschung im Bereich PAH, da die Proliferation dieser Zellen und die daraus resultierende zunehmende Muskularisierung der pulmonalen Arterien einen der primären pathophysiologischen Vorgänge darstellt.

Da es sich bei diesen Zellen nicht um unsterbliche Zelllinien wie beispielsweise HeLa-Zellen, sondern um Primärzellen handelt, kann jede Charge dieser Zellen nur eine begrenzte Anzahl an Teilungen vollziehen, bevor die Zellen beginnen zu entarten. Vom Hersteller Lonza wird eine Zahl von 15 Verdopplungspassagen angegeben, wobei die Zellen in Passage 3 ausgeliefert werden (63). Der Vorteil von Primärzellen gegenüber immortalisierten Zelllinien besteht trotz der aufwändigen Isolation, sowie meist schwierigeren Kultivierung darin, daß es sich um exakt die Zellen handelt, die im lebenden Organismus zu finden sind, während bei Zelllinien nach einiger Zeit keine Sicherheit mehr besteht, ob diese Zellen noch identisch mit denen des Zielobjektes sind oder ob diese beispielsweise relevante Rezeptoren nicht oder nur verändert exprimieren.

Desweiteren hat die Durchführung von Zellkulturversuchen den Vorteil, daß die Physiologie der menschlichen Zellen deutlich besser für die Erforschung von Medikamenten geeignet ist, als die anderer Organismen, wie beispielsweise der Wanderratte (*rattus norvegicus*). Allerdings ist hier zu berücksichtigen, daß die Arbeit mit isolierten Zellen zwar den Vorteil bringt, den Einfluss anderer Zellen, wie beispielsweise ECs im lebenden Organismus auszuschließen, jedoch kann das ein ebenso großer Nachteil sein, da eben dieser Einfluss anderer Zellen dafür sorgen kann, daß Ergebnisse aus Zellkulturversuchen nicht immer in klinischen Studien zum selben Ergebnis führen müssen. Daher ist es sinnvoll, relevante Ergebnisse zusätzlich durch *in vivo* Versuche im Ratten- oder Mausmodell zu überprüfen.

2.3.2 Das MCT-Rattenmodell

Der Ausbildung einer PAH liegen eine Vielzahl genetischer, molekularer und humoraler Faktoren zu Grunde, welche auf komplexe Art interagieren, um schließlich die Reorganisation von Pulmonalarterien zur Folge zu haben. Um die pathomechanistischen Vorgänge bei der pulmonalen Hypertonie nachzuvollziehen, werden Tiermodelle verwendet, deren Aufgabe es ist, die Pathophysiologie und molekularbiologischen Veränderungen während des Krankheitsverlaufs zu simulieren. Dies wird durch den Einsatz einer Vielzahl chemischer, physiologischer und molekularer

Stimuli erreicht. Eines dieser Modelle ist das Monocrotalin (MCT) Rattenmodell, in dem mittels eines inflammatorischen Stimulus eine PH induziert wird. Die Folgen sind endothelialer Zelltod, sowie eine Reduktion der peripheren Arterien (64), (65).

MCT wird aus den Samen von *Crotalaria spectabilis* gewonnen und gehört zu den Pyrrolizidinalkaloiden (66), (67). Subkutan verabreicht wird dieses Alkaloid in der Leber verstoffwechselt, wodurch das reaktive Dehydromonocrotalin entsteht (64), (68). In den Blutstrom freigesetzt gelangt das Dehydromonocrotalin in die Lunge, welche das nächstgelegene distale Gefäßbett der Leber darstellt (66). Hier führt die Substanz zu einer Schädigung des Endothels, was die Permeabilität dieser Zellschicht erhöht (69), (70), (71) und so eine Thrombozytenaggregation zur Folge hat. Gleichzeitig werden Wachstumsfaktoren und Zytokine aus dem Endothel freigesetzt, was schließlich der Auslöser der verstärkten Muskularisierung bereits muskularisierter Gefäße und einer *de novo*-Muskularisierung von normalerweise nicht muskularisierten, kleineren Gefäßen ist (72), (73), (74), (75), (76). Die SMCs produzieren zusätzlich weitere Wachstumsfaktoren und Matrixmetalloproteasen (MMPs) und weisen eine veränderte Kollagen- und Elastinsynthese auf (77), (78). Hierdurch wird der Wachstumsprozess weiter unterstützt.

Innerhalb von 24 Stunden wird das durch die Zytochrom-P450-Monooxygenasen verstoffwechselte Monocrotalin fast vollständig über die Nieren ausgeschieden, so daß es danach nicht mehr im Körper nachweisbar ist (15), (79), (80). Dies läßt den Schluß zu, daß eine einmalige Endothelschädigung durch MCT ausreichend ist, um den Gefäßumbau auszulösen (80).

2.4 Der Transforming Growth Factor β

Bis heute sind mehr als 30 Mitglieder der „Transforming growth factor β “ (Transformierender Wachstumsfaktor beta, TGF- β) Überfamilie bekannt. Die Proteine, welche durch die Gene dieser Überfamilie codiert sind, werden so prozessiert, daß das carboxyl-terminale Ende das gereifte Peptid enthält. Diese Peptide dimerisieren und werden von der Zelle ausgeschieden (81).

Neben der TGF- β Familie selbst enthält die TGF- β Überfamilie weitere Familien (siehe Abbildung 2-5), wie die Aktivinfamilie oder die „Bone Morphogenetic Proteins“ (Knochenmorphogenetische Proteine, BMPs). Die Mitglieder der TGF- β Familie TGF- β 1, -2, -3 und -5 sind wichtige Regulatoren für die Bildung einer extrazellulären Matrix oder die Steuerung der Zellteilung, wobei sie fördernd, als auch hemmend wirken können (82). Es ist schwierig, die einzelnen Effekte der TGF-Familienmitglieder separat zu definieren, da Mitglieder dieser Familie ähnlich funktionieren und in der Lage sind, Verluste anderer, gemeinsam aktivierter Familienmitglieder auszugleichen (81).

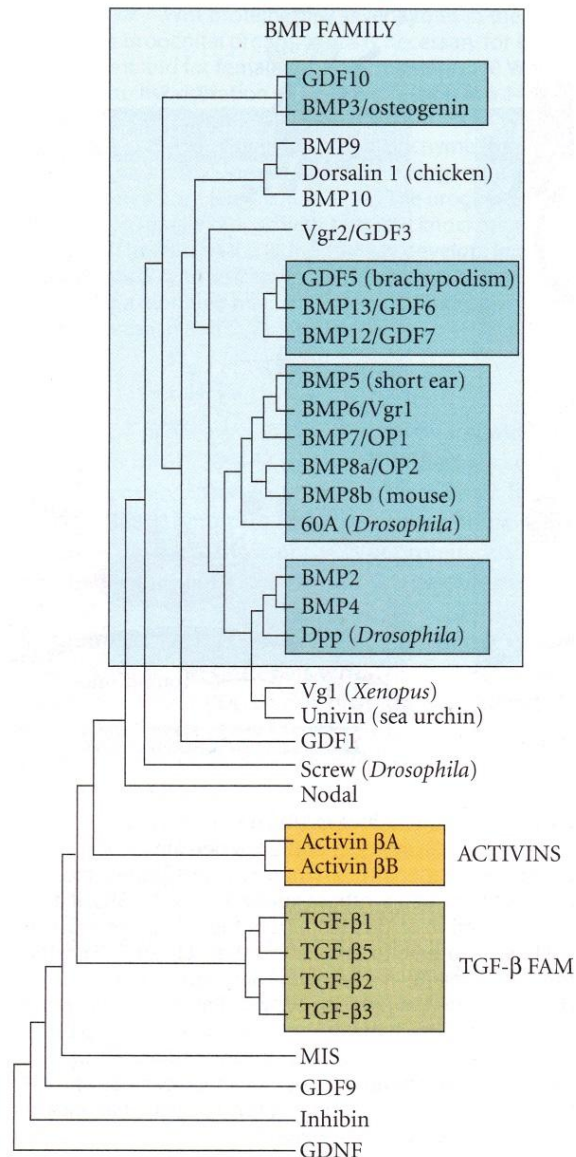


Abbildung 2-5: Verhältnisse zwischen den Mitgliedern der TGF- β Überfamilie. BMP Family = Bone morphogenetic protein family, Dpp = Decapentaplegic (*Drosophila* Äquivalent zu BMP), Vg = vegetalising factor (*Xenopus* Homolog zu TGF- β), GDF = Growth differentiation factor, Vgr = Vg related gene, TGF- β = Transforming growth factor β , MIS = Myeloid inhibitory siglec, GDNF = Glial cell line-derived neurothrophic factor (Gilbert, Scott F., *Developmental Biology*, 8th Edition, August 2006, Sinauer Verlag, ISBN 0-87893-250-X).

2.5 Der BMP-/SMAD- Signalweg

2.5.1. Die BMP Ligandenfamilie

BMPs gehören zur Gruppe der TGF- β Liganden, die zuerst in Extrakten der Knochenmatrix von Ratten identifiziert wurden. Der Name stammt von der Fähigkeit, bei subkutaner Injektion eine ektopische Knochenbildung zu induzieren (83). Heute ist bekannt, daß BMPs eine essentielle Rolle in der Entwicklung nahezu aller Vertebratenorgane spielen, einschließlich des embryonalen Gefäßsystems (84), (85). Einige dieser Liganden können ebenso als Wachstums- und Differenzierungsfaktoren

(„Growth and Differentiation Factors“; GDFs) bezeichnet werden. Mittlerweile sind 15 dieser BMP/GDF Liganden identifiziert worden, die wiederum BMP-typische Antworten hervorrufen. Einige dieser Liganden wurden allerdings nicht treffend benannt, beispielsweise ist BMP3 eher als BMP Antagonist zu verstehen, da es inaktive BMP Rezeptor Signalkomplexe durch Bindung „blockiert“ (86), (87).

2.5.2. Extrazelluläre Regulation von BMP Liganden

Verschiedene Antagonisten und andere nicht-Rezeptor-bindende Proteine regulieren die langfristigen Effekte der BMP Liganden (88). Beispiele hierfür sind Noggin, Follistatin und Angehörige der Chordin Familie. Diese Proteine hemmen die BMP-Aktivität, indem sie die Liganden abfangen, so daß diese nicht mehr zu den Rezeptoren gelangen können und/oder die Degradation der Liganden gefördert wird (88). Die Bindung zwischen Ligand und Inhibitor ist hoch spezifisch, beispielsweise bindet Noggin mit hoher Affinität an BMP2, BMP4 oder BMP7, hemmt jedoch weder BMP9 noch BMP 10 (89), (90). Chordin hingegen hemmt ausschließlich BMP2, BMP4 und BMP7, interagiert aber mit keinen anderen BMP Liganden. (91)

2.5.3. BMP Rezeptoren

Die Signaltransduktion wird ausgelöst durch Bindung an Rezeptoren und Bildung eines heterotetramerschen Komplexes. Dieser Komplex setzt sich aus Typ 1 BMP Rezeptoren, wie beispielsweise den „Aktivin receptor like Kinases“ (ALK) 1, 2, 3 (=BMPR1A), 6 (=BMPR1B) und Typ 2 BMP Rezeptoren, wie BMPR2, ACVR-2A und ACVR-2B (Aktivin receptor type-2A and 2B) zusammen (92), (93). Die Ligandenbindung und anschließende Oligomerisation bringen die Typ 2 Rezeptor-Tyrosinkinase-Domäne nah an den Typ 1 Rezeptor, wodurch eine Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten in der „GS-Box“ N-terminal zur Kinase-Domäne des Typ 1 Rezeptors begünstigt wird (81). Die daraus resultierende Konformationsänderung des Typ 1 Rezeptors sorgt für eine Aktivierung der Kinase-Domäne und eine erhöhte Affinität für das SMAD (MAD = Mothers against decapentaplegic gene; Sma = small body size protein) Substrat. Das wiederum begünstigt die Phosphorylierung einer konservierten Sequenz am C-Terminus rezeptoraktivierter SMADs, den sogenannten R-SMADs (92). Zu den SMADs, die durch die aktivierte Kinase des Typ 1 BMP Rezeptors phosphoryliert und aktiviert werden, gehören SMAD1, SMAD5 und SMAD8. Rezeptoren, die durch TGF- β /Aktivin aktiviert werden (beispielsweise der TGF- β Rezeptor 1, 2 oder ALK5), wiederum aktivieren SMAD2 und SMAD3 (94), (95), (96), (97). BMPR2 besitzt als einziger dieser Rezeptoren eine lange C-terminale Sequenz, die sogenannte „Tail-Domain“ (TD), welche dazu dient, BMPR-

regulierte SMADs zu stabilisieren. Bei Aktivierung des Rezeptors löst sich das Tribbles-like protein 3 (Trb3) von der BMPR2-TD und leitet so die Degradation der SMAD ubiquitin ligase 1 (SMURF1) ein (98).

Die Typ 1 BMP Rezeptoren lassen sich auf Grund ihrer Sequenz in zwei Gruppen unterteilen, die Alk1/2 Gruppe und die Alk3/6 Gruppe (99). BMP2 und BMP4 binden an ALK3 und ALK6, allerdings können diese Typ 1 Rezeptoren anschließend nur an Typ 2 Rezeptoren wie BMPR2, ACVR-2A oder ACVR-2B binden (100), (101). Im Gegensatz dazu binden BMP5, BMP6, BMP7 und BMP8A/B hochaffin an ACVR-2A oder ACVR-2B, um dann einen Typ 1 Rezeptor in den Komplex mit aufzunehmen (102).

TGF- β selbst bindet an den Typ 1 TGF- β Rezeptor, um dann einen heteromeren Komplex mit ALK-1, ALK-2 oder ALK-3 zu bilden (103), (94). Dies erklärt die gemeinsame Aktivierung von SMAD1/5/8 und SMAD2/3 in einer Vielzahl von Zelltypen (103), (104). Während der BMPR2 Rezeptor ausschließlich mit Mitgliedern der BMP Familie interagiert, interagieren ACVR-2A und ACVR-2B hingegen mit Aktivinen, GDF8 und GDF11, welche wiederum TGF- β /Activin Typ 1 Rezeptoren in den Signalkomplex hinzuziehen. BMP3 und Inhibin können den BMP Signalweg hemmen, indem sie Typ 2 Rezeptoren binden, ohne diese zu aktivieren und so zu einer intrazellulären Einlagerung (Sequestrierung) des Rezeptors führen (86), (87), (102).

2.5.4. BMP Corezeptoren

Neben den BMP-Rezeptoren sind in den letzten Jahren auch mehrere Corezeptoren identifiziert worden, die den SMAD-Signalweg durch Veränderung der BMP-Ligand-Rezeptor-Interaktionen beeinflussen können. Beispiele, die eine nicht unrelevante Rolle in vaskulärer Entwicklung und Krankheit spielen, sind Betaglycan (=TGF β R3) und Endoglin (=CD105) (105). Betaglycan wird an der Zelloberfläche vieler Zelltypen exprimiert und ist eines der wichtigsten TGF- β -bindenden Proteine. Allerdings interagiert es auch direkt mit BMP2, BMP4, BMP7, GDF5 (106) und Inhibin (107). Die Verstärkung des BMP Signalings erreicht Betaglycan dadurch, dass es das Binden eines BMP Liganden durch BMP Typ 1 Rezeptoren wie ALK3 und ALK 6 verbessert (106). Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß Betaglycan BMP2 und BMP7 Signaling hemmt, indem es BMPR2 und ACVR-2 Rezeptoren zusammen mit Inhibin in inaktive Komplexe bindet (87).

Endoglin interagiert auch mit TGF- β , kann aber ebenso nachgeschaltete Stoffwechselwege anderer Liganden der TGF- β Überfamilie wie Activin A, BMP2, BMP7 und BMP9 beeinflussen. Zu finden ist es primär auf der Oberfläche von ECs. Endoglin verstärkt die BMP7- und BMP9- abhängigen SMAD1/5

Antworten (108), (109), jedoch ist der verantwortliche Mechanismus hierfür noch weitestgehend unbekannt (102).

2.5.5. SMAD Signaling

Die ligandenabhängige Aktivierung des TGF- β Family Rezeptor-Signalkomplexes initiiert mehrere Ereignisse in der Zelle, die wiederum transkriptionelle und nicht-transkriptionelle Antworten auslösen. Unter anderem werden durch die aktivierte Typ 1-Rezeptor-Kinase die R-SMADs phosphoryliert. Das hat eine Steigerung der Affinität zu SMAD4 zur Folge, welches daraufhin mit den R-SMADs einen heteromeren R-SMAD/SMAD4 Komplex bildet. Dieser Komplex gelangt schließlich in den Nucleus um dort mehrere transkriptionelle Antworten zu aktivieren (110).

Die Dauer und Intensität des „SMAD Signaling“ wird durch mehrere Faktoren reguliert. So hemmen die inhibitorischen SMADs 6 und 7 (I-SMADs) kompetitiv die Phosphorylierung durch den Typ 1 Rezeptor (111), (112). Ein möglicher Regulationsmechanismus ist eine negative Rückkopplungsschleife (feedback loop). Ausgelöst durch ein TGF- β aktiviertes Signal binden I-SMADs an den Rezeptoren und führen so zu deren Degradation (113), (114), (115), (116). So induziert BMP Signaling direkt auch SMAD6 und die SMAD Ubiquitin-Ligase 1 (SMAD ubiquitylation regulatory factor 1, SMURF1), während SMAD7 zusammen mit SMURF1 oder SMURF2 durch TGF- β 1 aktiviert wird (117), (118), (119). Im Nucleus können zudem aktivierte R-SMADs durch die Phosphatasen Protein phosphatase 1A (Ppm1A) und *S. cerevisiae* CalPonin 1-3 (Scp1-3) dephosphoryliert werden (120). Desweiteren können R-SMADs auch durch Phosphorylierung der Linker- und N-terminalen Domäne gehemmt werden, da hierdurch der Import in den Zellkern erschwert und die Degradation durch SMURF1 begünstigt wird.

Sind die R-SMAD/SMAD4-Komplexe schließlich in den Zellkern gelangt, binden sie entweder direkt an sogenannte „SMAD binding elements“ (SBEs) oder indirekt durch Interaktionen mit DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren und Histon-modifizierenden Faktoren (110). Zusätzlich zu den transkriptionellen Antworten regulieren TGF- β - und BMP-aktivierte SMADs auch die Prozessierung von MikroRNAs über Drosha-Komplexe. Dieser Mechanismus ist im Gegensatz zur Interaktion mit Transkriptionsfaktoren vollkommen unabhängig von SMAD4 (121), (102).

2.6 Stickstoffmonoxid, die Phosphodiesterase 5 und Sildenafil

Im Folgenden soll auf den NO-Stoffwechselweg, welcher von Sildenafil beeinflusst wird, genauer eingegangen werden.

2.6.1 Die Phosphodiesterase 5

Insgesamt konnten bis heute 11 Phosphodiesterase- (PDE) Familien identifiziert werden, welche sich in Substrataffinität, Selektivität und Regulatormechanismen unterscheiden (122). Von diesen Enzymen sind PDE5, -6 und -9 hoch selektiv für cGMP, während PDE1, -2 und -11 zyklisches Adenosin-Monophosphat (cAMP) mit gleicher Affinität binden (123). PDE5-mRNA wird in nahezu allen menschlichen Geweben exprimiert, jedoch ist sie hauptsächlich in Lungengewebe und PASMCs zu finden (124).

Es konnte nachgewiesen werden, daß die Expression von PDE5 in PH Patienten höher ist, als in gesunden Individuen (125).

2.6.2 NO-abhängige cGMP Synthese durch sGC

Die Produktion von endothelalem NO und die Stimulation der SMC sGC um die intrazelluläre cGMP-Konzentration zu erhöhen, wodurch schließlich die Vasodilation gefördert, sowie die Proliferation gehemmt wird, ist ein wichtiger Stoffwechselweg im pulmonalen Blutkreislauf (126).

NO ist ein hoch reaktives Molekül, welches aus L-Arginin durch die NO-Synthasen (NOS), „endothelial“ NOS (eNOS), „inducible“ NOS (iNOS) und „neuronal“ NOS gebildet wird (123). Studien mit Knockout-Mäusen zeigten, daß das eNOS vermittelte NO hauptverantwortlich für die endothelabhängige Vasodilatation im pulmonalen Kreislauf ist, während eNOS und iNOS hingegen eine Rolle in der Steuerung des Basaltonus spielen. Nach seiner Ausschüttung aus den Endothelzellen diffundiert NO in die umliegenden SMCs. Dort aktiviert es die sGC, was eine erhöhte Umwandlung von Guanosintriphosphat (GTP) in zyklisches GMP zur Folge hat (siehe Abbildung 2-6), (123), (127).

Abgebaut wird cGMP zu Guanosinmonophosphat (GMP), wodurch sich ein Gleichgewicht aus cGMP-Synthese und -Degradation bildet. Verantwortlich für die Hydrolyse von cGMP ist hauptsächlich PDE5, welche in pulmonalen Blutgefäßen deutlich höher exprimiert wird, als in den Gefäßen des großen Blutkreislaufs (32).

Kürzlich konnte eine Verbindung zwischen dem BMP Signalweg und der cGMP-abhängigen Kinase I (cGMP-dependent kinase I, cGKI) nachgewiesen werden. In Versuchen mit Mausmyoblasten-Zelllinien

wurde gezeigt, daß cGKI mit BMPR2 interagiert und daß bei BMP-Stimulation cGKI freigesetzt wird, um sich mit aktivierten SMAD-Proteinen zu verbinden und so die Genexpression im Nukleus als Cofaktor der SMADs mitzuregulieren (128).

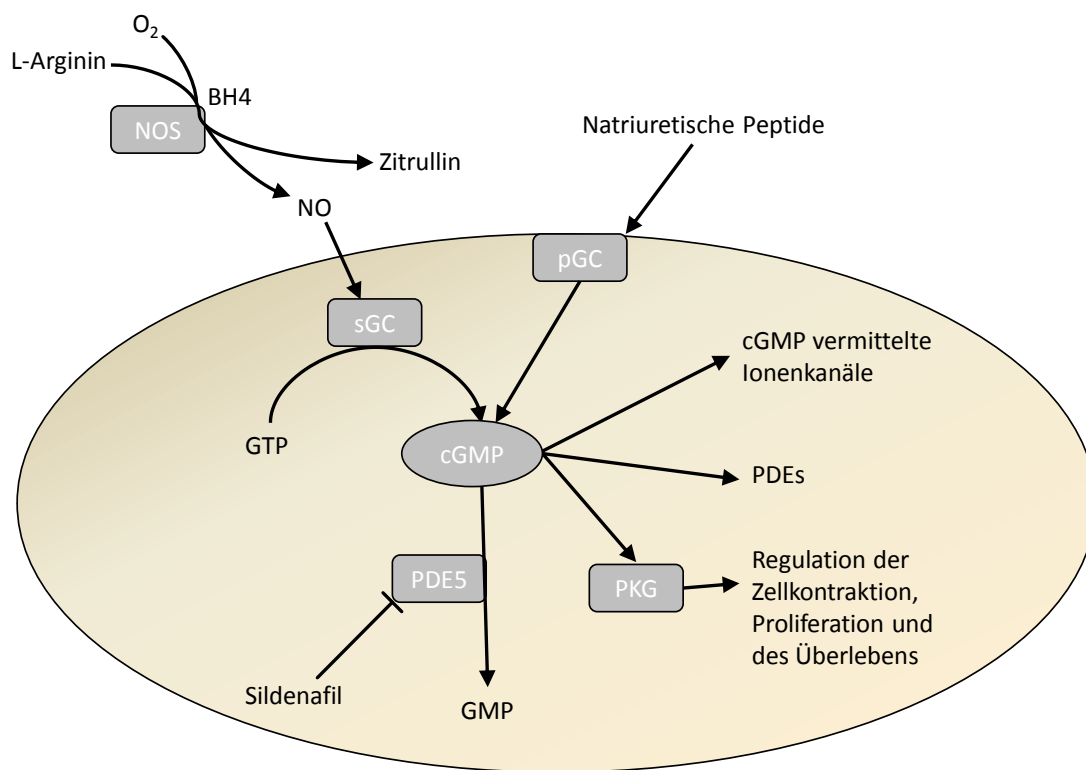


Abbildung 2-6: Schematisches Diagramm des Stickstoffmonoxid- (NO) und cyclischen Guanosinmonophosphat-Signalwegs. NO wird aus L-Arginin durch die NO synthase (NOS) mit Hilfe des Cofaktors tetrahydrobiopterin (BH4) synthetisiert. In vaskulären Muskelzellen interagiert NO mit der löslichen Guanylatcyclase (sGC) um Guanosin triphosphat (GTP) in zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) umzuwandeln. Dieses wird schließlich durch Phosphodiesterase 5 (PDE5) zu Guanosinmonophosphat (GMP) hydrolysiert und somit inaktiviert. Die Funktion besteht in der Regulation cGMP-vermittelter Ionenkanäle und PDEs, sowie der Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase (PKG). Die Aktivierung der PKG führt schließlich zur Regulation mehrerer nachgeschalteter Ziele, was schließlich eine Regulation der Zellkontraktion, Proliferation und des Zellüberlebens zur Folge hat. Desweiteren kann der cGMP-Spiegel auch durch andere Faktoren wie Natriuretische Peptide, die wiederum die partikuläre Guanylatcyclase (pGC) aktivieren, beeinflusst werden. (Verändert nach: Phosphodiesterase inhibitors for the treatment of pulmonary hypertension, M.R. Wilkins, J. Wharton, F. Grimminger and H.A. Ghofrani. Eur Respir J 2008; 32: 198–209.)

2.6.3 Sildenafil

Verringerte NO-Produktion und erhöhte PDE5-Expression und -Aktivität sind zwei wichtige pathologische Faktoren von PAH. Die daraus resultierende Verringerung des intrazellulären cGMP

Levels führt zu Vasokonstriktion und Proliferation von vaskulären SMCs. Der PDE5-Inhibitor Sildenafil erhöht die intrazelluläre cGMP Konzentration und fördert so die Vasodilatation, weswegen es als wirksames Medikament für PAH eingesetzt wird (129), (130).

cGKI wird in hohem Maße in vaskulären SMCs exprimiert und spielt eine wichtige Rolle in der NO/cGMP Signaltransduktion und dem Gefäßtonus (129). Obwohl die Möglichkeit besteht, daß cGKI an der antiproliferativen Wirkung von BMPs auf SMCs beteiligt ist (128), konnte bisher nicht nachgewiesen werden, ob die positiven Effekte von Sildenafil durch Einwirkung auf den BMP Signalweg von PASMCs verursacht werden (129).

Laboruntersuchungen konnten jedoch zeigen, daß Sildenafil während einer BMP4-Stimulation die SMAD1/5-Phosphorylierung über einen cGMP/cGKI-abhängigen Mechanismus verstärkt (129) und sogar teilweise den Defekt in SMAD1/5-Phosphorylierung und ID1 (Inhibitor des DNA-bindenden Proteins I, Inhibitor of DNA binding Protein I) Genexpression durch eine BMPR2-Mutation, sowie den BMP4-vermittelten antiproliferativen Effekt in BMPR2-mutierten Zellen wiederherstellen kann (129), (131). *In vivo* Studien zeigten außerdem, daß Sildenafil den Fortschritt von pulmonaler Hypertonie hemmt und das BMP-Signaling im Monocrotalin-(MCT-)Rattenmodell, welches durch BMPR2 Fehlfunktion charakterisiert ist – fördert (132).

2.7 PDGF, der PDGF-Rezeptor und Imatinib

Aktivierung eines PDGF Rezeptors führt zur Stimulation des Zellwachstums (Proliferation), beeinflusst aber ebenso die Zellform und –Beweglichkeit, indem die Reorganisation des Aktin-Filamentsystems ausgelöst und die Chemotaxis stimuliert wird, beispielsweise zu einem PDGF-Gradienten hin. *In vivo* hat PDGF mehrere wichtige Aufgaben, u.a. während der Embryonalentwicklung oder der Heilung von Wunden. Ein Überschuss an PDGF hingegen konnte in mehreren Krankheitsbildern beobachtet werden. So ist das Onkogen des „Simian sarcoma Virus“ (SSV) mit der B-Kette des PDGF Liganden verwandt, wodurch SSV Transformation ebenso eine autocrine Stimulation durch ein PDGF-ähnliches Molekül zur Folge hat. (133)

2.7.1 PDGF und der PDGF-Rezeptor

PDGF gehört zu einer Familie disulfidgebundener, dimerischer Isoformen und ist ein wichtiges Mitogen für das Wachstum, die Funktion und das Überleben in verschiedenen Arten von Bindegewebszellen (134). Bisher konnten vier verschiedene PDGF-Ketten identifiziert werden, PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C und PDGF-D, die sich zu Homo- und Heterodimeren zusammensetzen (135).

PDGFs arbeiten via 2 Rezeptor-Tyrosinkinasen (PDGFR α und PDGFR β) mit gemeinsamen Domänenstrukturen, einschließlich 5 extrazellulären Immunglobulinschleifen und einer gespaltenen intrazellulären Tyrosinkinasedomäne. Obgleich *in vitro* viele verschiedene PDGF-PDGFR Interaktionen möglich sind und sich auf diese Art viele verschiedene Komplexe bilden können (133), sind die Alternativen *in vivo* hingegen sehr begrenzt: PDGF-AA und CC interagieren lediglich mit PDGFR- α , während PDGF-BB und PDGF DD mit PDGFR- β interagieren (134), (136). Genetische Studien an Mäusen haben gezeigt, daß die Gene für die beiden Liganden A und B für eine normale Entwicklung ebenso essentiell sind wie die beiden PDGF-Rezeptorgene (137).

PDGFs agieren primär als parakrine Wachstumsfaktoren. Sie werden in der Regel durch einzelne Zellpopulationen gebildet, wirken räumlich begrenzt und rufen unterschiedliche zelluläre Antworten hervor (138), (139). Die Expressionsmuster der PDGF-Liganden und -Rezeptoren werden *in vivo* während der Entwicklung sowie als bestimmte physiologische hypertrophe Antworten streng räumlich und zeitlich reguliert. In kultivierten Zellen ist die Expression dynamisch und reagiert als Antwort auf eine Vielzahl von Stimuli, wie beispielsweise Hypoxie, Thrombin, Zytokine und Wachstumsfaktoren, bis hin zu PDGF selbst (133). Ähnlich verhält es sich mit der Expression der PDGF-Rezeptoren. Normalerweise ist die mesenchymale Expression der PDGFRs *in vivo* gering, kann jedoch während einer Entzündung oder durch Kultivierung stark gesteigert werden. Einige der Faktoren, die die gesteigerte PDGF-Expression hervorrufen können, sind TGF- β , der Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (FGF-2) und der Tumornekrosefaktor α (TNF- α) (133).

PDGF-B wird hauptsächlich in in vaskulären Endothelzellen gebildet, sowie in Megakaryozyten und Neuronen. PDGF-A und -C werden bevorzugt in Epithelzellen, Muskeln und neuronalen Vorläuferzellen produziert, während die Bildung von PDGF-D u.a. in Fibroblasten und SMCs beobachtet wurde. (136)

2.7.2 Der PDGF-Signalweg

Die Diffusion von PDGF in dem Gewebezwischenraum wird reguliert durch das Binden an extrazelluläre Matrixkomponenten. Für PDGF A und B wird diese Bindung mitunter durch positiv geladene c-terminale Bereiche, welche einen großen Anteil basischer Aminosäuren enthalten, erreicht. Den PDGF-Ketten C und D fehlen diese Bereiche, stattdessen haben sie CUB-Domänen, die Protein-Protein-, sowie Protein-Kohlenhydratinteraktionen verursachen können und auf diese Weise an der extrazellulären Verbreitung beteiligt sind. (136)

Durch die Bindung des PDGF-Liganden dimerisiert der PDGF-Rezeptor, was zu einer Autophosphorylierung und damit einer Aktivierung der RTK führt, wodurch Andockstellen für

stromabwärts liegende Signalmoleküle verfügbar werden (140), (141). Der PDGFR- α als auch der PDGFR- β aktivieren darauf mehrere Signalwege, u.a. Ras-MAPK, PI3K und PLC- γ , die wiederum in diverse zelluläre Antworten involviert sind (136).

Abgesehen von der Aktivierung dieser Signalwege, werden auch Reaktionen ausgelöst, die unabhängig sind von Genexpression oder Proteinsynthese. So sorgen PDGFR- α und PDGFR- β für eine Reorganisation von Aktinfilamenten oder – PDGFR- β etwas effizienter als PDGFR- α – für eine Aktivierung der Ca^{2+} -Kanäle (142), (143).

2.7.3 Der Kinaseinhibitor Imatinib

Um den PDGF-Rezeptor zu hemmen, sind mehrere Methoden entwickelt worden. So können beispielsweise Rezeptoren oder Liganden mittels netralisierender Antikörper experimentell „ausgeschaltet“ werden (144). Eine andere Möglichkeit der Inaktivierung ist die Hemmung der Kinaseaktivität des PDGF-Rezeptors. Kinase-Inhibitoren binden in oder nahe der ATP-Bindestelle und können so auch PDGFR hemmen. Allerdings ist diese Inhibition nicht absolut spezifisch. Imatinib hemmt wegen des ähnlichen Aufbaus der Kinasedomänen neben PDGFR- α und PDGFR- β auch das BCR-ABL (BCR = „breakpoint cluster region“-Gene auf Chromosom 22; ABL = „Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1“) Fusionsprotein, für das es ursprünglich entwickelt wurde (145), sowie c-kit (c-kit = „Mast/stem cell growth factor receptor“) und Flt3 (Flt3 = „Fms-like tyrosine kinase 3“). Entwickelt wurde es für Patienten mit Philadelphia-Chromosom-positiver Leukämie (welche das BCR-ABL Fusionsprotein tragen) (146) oder Gastrointestinalen Stromatumoren (GIST), die aktivierende Mutationen in c-kit oder PDGFR- α besitzen (147).

Vaskuläre SMC Hyperplasie und gesteigerte Expression von PDGFs und PDGFRs konnten bereits in diversen Tiermodellen (148), (149), als auch im Menschen mit PAH in Zusammenhang gebracht werden (60). Auch konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, daß Imatinib in der Lage ist, PAH in Tiermodellen rückgängig zu machen (60), indem es die PASMC-Proliferation und Neointimabildung umkehrt. Obwohl Imatinib nicht absolut spezifisch ist, kann dieser Effekt dem PDGF-Signalweg zugeschrieben werden, da die anderen Ziele von Imatinib (ABL, c-Kit und Flt3) nicht am SMC-Wachstum beteiligt sind. Der therapeutische Effekt durch die Behandlung mit Imatinib im Tiermodell war größer, sowie die Nebenwirkungen geringer als dies mit zuvor erprobten Therapien der Fall war (60). (136)

2.8 Ziel dieser Arbeit

Obwohl BMPR2-Mutationen sehr selten in nicht-familiärer PAH zu finden sind, wurde dennoch in vielen PAH-Fällen ein gestörter SMAD-Signalweg beobachtet. So wurde beispielsweise von Morrell *et al.* nachgewiesen, daß Zellen aus PAH-Patienten eine gestörte Reaktion auf BMP-Signale zeigen (150). Des Weiteren konnten Atkinson *et al.* eine verringerte BMPR2 Expression trotz Fehlen einer entsprechenden Mutation beobachten (151), desweiteren wiesen Morty *et al.* nach, daß die BMPR2-Expression in den Lungen von MCT-Ratten ebenfalls reduziert ist(152). (153)

In familiärer PAH hingegen führen BMPR2 Mutationen oft entweder zu einer direkten Inaktivierung des Rezeptors oder zu einem gestörten Transport neugebildeter Rezeptoren zur Zelloberfläche. Eine Methode, diesen Defekt des Signalwegs mittels viraler Vektoren oder durch die Verwendung chemischer Chaperone zu kompensieren, wird derzeit untersucht (154). All diese Daten belegen die Wichtigkeit, den SMAD-Signalweg besser zu verstehen.

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, inwiefern ein durch PAH gestörter BMP- bzw. SMAD-Signalweg durch die Medikation mit Sildenafil und/oder Imatinib beeinflusst werden kann und welche Folgen dies auf zellulärer Ebene als auch für den Organismus hat. Dabei standen folgende Fragestellungen im Vordergrund:

1. Übt eine Behandlung mit Sildenafil und/oder Imatinib einen Einfluß auf den SMAD-Signalweg aus? Wenn ja, was bedeutet dies für andere Schlüsselpunkte des Stoffwechsels, wie Zellzyklus oder ausgewählte Kinasen?
2. Auf welche Weise übt Sildenafil einen Effekt auf den BMP Signalweg aus?
3. Zeigt eine Kombinationsbehandlung mit Sildenafil und Imatinib einen positiven Effekt gegenüber einer Einzelbehandlung mit einer der beiden Substanzen?
4. Ist ein gestörter BMP-Signalweg nur ein Symptom, also eine Folge der PAH oder kann durch alleinige Wiederherstellung dieses Signalwegs auch das Krankheitsbild verbessert werden?
5. Welche Auswirkungen hat die Kombinationsbehandlung mit Sildenafil und Imatinib auf die Pulmonalarterien, sowie das Herzkreislaufsystem?

Um diesen Fragestellungen nachzugehen, wurde in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich mit isolierten, menschlichen PASMCs gearbeitet, da diese primär für die Muskularisierung kleiner pulmonalarterieller Gefäße bei PAH verantwortlich sind. Für die physiologischen Untersuchungen wurde hingegen das MCT Rattenmodell gewählt.

3. Material und Methoden

3.1 Material

Im Folgenden werden die verwendeten Materialien aufgezeigt. Hierfür wurden die einzelnen Artikel nach ihrem Anwendungsgebiet in Gruppen zusammengefasst und tabellarisch aufgelistet. Um Doppelnennungen zu vermeiden, wurde jeder Artikel, der in Materialauflistungen bereits genannt wurde in späteren Auflistungen nicht erneut aufgeführt.

3.1.1 Humane pulmonal-arterielle glatte Muskelzellen (hPASCs)

Es wurden ausschließlich humane pulmonal-arterielle glatte Muskelzellen der Firma Lonza verwendet (Best. Nr. cc-2581), die tiefgekühlt in Cryovials geliefert wurden. Für Versuche wurden die Passagen 6 und 7 dieser Zellen verwendet.

3.1.2 Zellkulturmedien und Substanzen

Tabelle 3-1: Übersicht der verwendeten Medien und Lösungen für das Anziehen und Splitten von pulmonal-arteriellen glatten Muskelzellen.

Artikel	Hersteller	Katalog-Nr.
SmBm (Basal Medium)	Lonza	cc-3181
SmGm-2 Bulletkit (+ Supplementmix)	Lonza	cc-3182
Trypsin/EDTA	PAN	P10-024100
FCS (FBS)	Biowest	51810
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma	D2438
DPBS	PAN	P04-36500

Tabelle 3-2: Auflistung der zur Zellstimulation verwendeten Wachstumsfaktoren, Inhibitoren und Substratanaloga.

Inhibitor/ Substratanalogon	Hersteller/ Quelle	Gelöst in	Verwendete Endkonzentrationen	Stock
FCS	Fa. Biowest, S1810	-	5 %	-
PDGF	PeproTech, 100-148	H ₂ O	30 ng/ml	10 ng/μl
Sildenafil	Pfizer	DMSO	1 μM, 10 μM	1 mM, 10 mM
Imatinib		DMSO	0,5 μM, 5 μM	1 mM
SB216763		H ₂ O	1 μM, 10 μM	1 mM
8-Br-cGMP	BioLog	H ₂ O	1 μM, 10 μM	1 mM
Rp-8-Br-cGMP	Santa Cruz	H ₂ O	1 μM, 10 μM	1 mM
8-pCPT-cGMP	Biolog	H ₂ O	50 ng/ml, 200 ng/ml	
DT-2	Biolog	H ₂ O	1 μM, 10 μM	1 mM
DT-3	Biolog	H ₂ O	1 μM, 10 μM	1 mM

3.1.3 Gewebeproben aus isolierten Rattenherzen und -lungen

Für RNA-Untersuchungen, die mit tierischem Gewebe durchgeführt wurden, kamen tiefgefrorene Proben der rechten Herzkammer von Rattenherzen zum Einsatz, die freundlicherweise von Frau Sandra Scheidl zur Verfügung gestellt wurden. Vor der Organentnahme wurde in den Tieren mittels einmaliger Monocrotalin- (MCT-) Injektion eine pulmonale Hypertonie verursacht. Nach 21 Tagen Inkubationszeit startete die 14-tägige Behandlung mit oral verabreichtem Placebo, Sildenafil (50mg/kg Körpermasse/d), Imatinib (50 mg/kg/d, bzw. 100 mg/kg/d) oder einer Kombination aus Sildenafil und Imatinib (je 50 mg/kg/d). Am Tag 36 nach der MCT Injektion wurden schließlich die Organe entnommen. Die Rattenherzen wurden für weitere Versuche tiefgefroren, während die Rattenlungen in 4%iger neutral gepufferter Formaldehydlösung fixiert und mittels flüssigem Paraffin entwässert, imprägniert und eingeblockt wurden.

3.1.4 Chemikalien, Puffer und Lösungen

3.1.4.1 Western Blot und Proteinisolation

Tabelle 3-3: Übersicht der für den Western Blot verwendeten Chemikalien

Artikel	Hersteller	Katalog-Nr.
Acrylamid 30 % (Rotiphorese Gel 30)	Roth	3029.1
APS (Ammonium persulfat)	Sigma	A3678
Beta-Mercaptoethanol	Sigma	M6250
Full Range Rainbow Marker	GE Healthcare	RPN800E
Glycin	Roth	3908.2
Milchpulver	Roth	T145.2
NaCl	Roth	P029.2
SDS 10 %	Appli Chem	A0675
TEMED (N,N,N,N-Tetramethylethylenediamine)	Sigma	T9281
Trizma	Sigma	T1503
TRIS 1,5 M pH 8,8	Amresco	M195-500 ml
TRIS 0,5 M pH 6,8	Amresco	M196-500 ml
TWEEN	Sigma	P7949

Tabelle 3-4: Zusammensetzung des zur Proteinisolation verwendeten RIPA-Lysis-Puffers (Santa Cruz, Katalog-Nr. sc-24948A)

Komponente	Endkonzentration	Volumen
RIPA [1x]	-	1 ml
PMSF [0,2M]	2 mM	10 µl
Natrium-Orthovanadat (0,1M]	1 mM	10 µl
Protease Inhibitorcocktail		1 Einheit*
*Protease Inhibitorcocktail (Roche): 1 Einheit entspr. 20 µl (1 Tablette gelöst in 200µl)		
*Protease-Inhibitorcocktail (Santa Cruz): 1 Einheit entspr. 10 µl		

Tabelle 3-5: Zusammensetzung des zur Gelelektrophorese verwendeten Acrylamid-Gels. Verwendet wurde ein 2-Phasengel bestehend aus Trenngel (10 %) und Sammelgel (6 %).

Trenngel				Sammelgel			
Komponente		Endkonzentr.	Volumen	Komponente		Endkonzentr.	Volumen
[Stock]				[Stock]			
TRIS/Cl	pH	375 mM	1,5 ml	TRIS/Cl	pH	125 mM	625 µl
8,9 [1,5 M]				6,8 [0,5 M]			
Acrylamid		10 %	2 ml	Acrylamid		6 %	500 µl
[30 %]				30%			
SDS [10 %]		0,1 %	60 µl	SDS 10%		0,1 %	25 µl
APS [10 %]		0,05 %	30 µl	APS 10%		0,05 %	12,5 µl
TEMED		0,1 %	6 µl	TEMED		0,1 %	2,5 µl
H ₂ O			2,4 ml	H ₂ O			1,34 µl

Tabelle 3-6: Zusammensetzung des für die Gelelektrophorese verwendeten Laufpuffers

Komponente	Endkonzentration	Masse bzw. Volumen für 1l
TRIS	25 mM	3 g
Glycin	192 mM	14,4 g
SDS [10 %]	0,1 %	10 ml

Tabelle 3-7: Zusammensetzung des für die Gelelektrophorese verwendeten 5-fach SDS-Probenpuffers

Komponente	Endkonzentration	Masse bzw. Volumen für 10ml
TRIS-Cl [2M; pH 6,8]	375 mM	1,875 ml
SDS	10 %	1 g
Glycerin	50 %	5 ml
β-Mercaptoethanol	12,5 %	1,25 ml
Bromphenolblau	Ca. 0,02 %	Spatelspitze
H ₂ O		1,875 ml

Tabelle 3-8: Zusammensetzung des verwendeten Blot-Puffers

Blot-Puffer		
Komponente	Endkonzentration	Masse bzw. Volumen für 1 l
TRIS	25 mM	6 g
Glycin	80 mM	3 g
Methanol	20 %	200 ml
H ₂ O		800 ml

Tabelle 3-9: Zusammensetzung der beiden verwendeten Stripping-Puffer**Stripping-Puffer (β -Mercaptoethanol-Methode) (30min 60°C Schwenken)**

Komponente	Endkonzentration	Volumen für 50ml
SDS [10%]	2 %	10 ml
TRIS-Cl [0,5M; pH 6,8]	62,5 mM	6,25 ml
β -Mercaptoethanol	0,8 %	0,4 ml
H ₂ O		33,35 ml

Stripping-Puffer (HCl-Methode) (105-120min Schwenken bei Raumtemperatur)

Glycerin	Sigma	G-5150
HCl 37 %	Roth	9277,2
H ₂ O	Millipore	

Tabelle 3-10: Zusammensetzung der Waschlösung 20-fach TBS (TRIS-gepufferte Salzlösung)

Komponente	Endkonzentration	Masse bzw. Volumen für 1l
TRIS	400 mM	48,4 g
NaCl	2,74 M	160 g
Der pH-Wert wurde mit HCL justiert		

1-fach TBST

TBS [20x]	1x	50 ml
TWEEN	0,001 %	1 ml
H ₂ O		950 ml

3.1.4.2 RNA- Isolation, cDNA-Synthese und PCR**Tabelle 3-11: Übersicht der verwendeten Chemikalien für die RNA-Isolation, cDNA-Synthese und Real-Time PCR**

Chemikalie	Hersteller	Katalog-Nr.
Chloroform minimum 99 %	Sigma	C2432-500 ml
Isopropanol (2 Propanol)	Sigma	33539
Isopropanol (2 Propanol) for RNA only	Merck	100.995
Wasser, DEPC behandelt	Roth	
Ethanol (100 %, hochrein)	J.T. Baker, 2,5 l	

Tabelle 3-12: Komponenten und Konzentrationen für die cDNA Synthese

Komponente	Volumen	Gesamtmenge	Programm
RNA [0,1µg/µl]	8 µl	0,8 µg	6 min 70 °C
Oligo(dT)15-Primer (500µg/ml)	2 µl	25 ng	
Komponente	Volumen	Gesamtkonzentration	Programm
Reaktionpuffer [5x]	8 µl	-	5 min 25 °C 1 h 42 °C 15 min 70 °C
MgCl ₂ [25mM]	4 µl	2,5 mM	
dNTP-Mix [10mM]	2 µl	0,5 mM	
Ribonuklease-Inhibitor [40U/µl]	1 µl	1 U/Probe	
Reverse Transkriptase	2 µl	-	
DEPC-behandeltes Wasser	13 µl	-	

Tabelle 3-13: Übersicht über die Komponenten der verwendeten PCR SYBR Green Kits

Invitrogen SYBR Green qPCR Supermix (Gesamtvolumen 25µl)		Biorad iTaq Universal Sybr Green Supermix, Best. Nr. 172-5122 (Gesamtvolumen 20µl)	
Komponente	Vol./Ansatz	Komponente	Vol./Ansatz
SYBR Green Mix	12,5 µl	SYBR Green Supermix + Rox	10 µl
MgCl ₂ (50mM)	1,0 µl	-	-
Fw. Primer (10%)	0,5 µl	Fw. Primer (10 %)	0,5 µl
Rv. Primer (10%)	0,5 µl	Rv. Primer (10 %)	0,5 µl
ROX	0,1 µl	-	-
H ₂ O	8,4 µl	H ₂ O	7 µl

3.1.4.3 Proliferationsassay

Tabelle 3-14: Übersicht der für den Proliferationsassay verwendeten Puffer und Lösungen

Komponente	Hersteller	Art. Nr.
H ₂ O	Roth	T143.3
Methanol	Sigma	32213-2,5 l
Hank's balanced salt solution (HBSS+/-)	PAA	H15-008
Trichloressigsäure	Sigma	T9159-250 g

3.1.4.4 Histologische Präparation und Färbungen

Tabelle 3-15: Auflistung der für die Histologie verwendeten Chemikalien und Lösungen

Komponente	Hersteller	Art. Nr.
Formaldehydlösung Rotipuran	Roth	4979.3
Roti-Plast Paraffin	Roth	6642.2
Xylol	Roth	9713.3
Zitratpuffer ph 6,0 (20x)	Zymed Lab	00-5000
Proteinase K	Sigma-Aldrich	P4850
Rodent R	Biocare	RBR962 G
Goat on Rodent AP Polymer	Biocare	112713
Warp Red Chromogen Kit	Biocare	WR806S
Hematoxylin	Invitrogen	00-8001
Pertex mounting media	Leica Biosystems	
Corbit		

3.1.5 Verbrauchsmaterial

3.1.5.1 Generelles Verbrauchsmaterial

Tabelle 3-16: Auflistung genereller Verbrauchsmaterialien

Gefäße	Pipettierzubehör	Weiteres Material
BD Falcon 50 ml	Pipettenspitze Blau (1000 µl)	Papierhandtücher zickzackgefaltet
BD Falcon 15 ml	Pipettenspitze Blau mit Filter (1000 µl)	Reinigungsethanol
Reaktionsgefäß 2 ml	Pipettenspitze Gelb (100 µl)	Rinderserumalbumin (Bovine serum albumine, BSA)
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Pipettenspitze Gelb mit Filter (100 µl)	Objektträger
Reaktionsgefäß 0,5 ml	Pipettenspitze Weiß (10 µl)	Abdeckglas für Objektträger
Reaktionsgefäß 0,2 ml	Pipettenspitze Weiß (2,5 µl)	
Reaktionsgefäß 1,5 ml (RNasefrei)	Pipettenspitze Weiß mit Filter (10 µl)	
Cryotube 2ml	Gellade-Pipettenspitze 100µl	
Schraubdeckelgefäß 2ml	Plastikpipette 50 ml	
Cell Culture Dish 10 cm	Plastikpipette 25 ml	
Cell Culture Dish 6 cm	Plastikpipette 10 ml	
6-Well-Platte für die Zellkultur	Plastikpipette 5 ml	
48-Well-Platte für die Zellkultur	Pasteurpipette	
96-Well-Platte für die Zellkultur		
Inkubationsgefäß (Glas) mit Deckel		
Objektträger-Inkubationsgefäß (Glas) mit Einschub und Deckel		

3.1.5.2 Verbrauchsmaterial für Proteinisolation und Western Blot**Tabelle 3-17: Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien während der Gelelektrophorese, des Blottings, der Antikörperhybridisierung und der Entwicklung des Röntgenfilms.**

Artikel	Hersteller	Katalog-Nr.
Blotting Paper dünn	Whatman	
Chromatographiepapier	VWR	514-8013
0,20 mm		
Luminata Forte Western HRP Substrat	Millipore	WBLUFO100
ECL plus Western Blotting Detection System	GE Healthcare	RPN2132
ECL Prime	GE Healthcare	RPN2232
Entwickler Unimatik D	Kalbe	10091
Film Hypersensitiv Hyperfilm ECL	GE Healthcare	28-9068-37
Film Normal Agfa Cronex 5	Agfa	ECODG
Fixierer Unimatik F	Kalbe	10094
Folie Sorangold 300 mm x 300 m	Roth	9068.1
Membran Trans Blot Transfer Medium	Bio Rad	162-0094

3.1.5.3 Verbrauchsmaterial für RNA-Isolation, cDNA Synthese und Real-Time PCR**Tabelle 3-18:** Auflistung der bei der RNA-Isolation, cDNA-Synthese und RT-PCR verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Artikel	Hersteller	Katalog-Nr.
ImProm-II Reverse Transcription System	Promega	A3800
iScript cDNA	BioRad	170-8891
iTaq Sybr Rox Mix	BioRad	172-5851
Oligo (dT) 15 Primer	Promega	C1101
Platinum Sybr Green qPCR Super Mix	Invitrogen	11733-046
Proteinase K	PEQLAB	04-1070
RNAse Away	Molekular Bio Produkts	7003
Thermo Fast 96, non-skirted	Thermo	AB-0600
Thermo Strips and Ultra Clear Caps	Thermo	AB-1183
Trizol Reagent	Invitrogen	15596-018
Ultra Clear Cap Strips natural	Thermo	AB-0866

3.1.5.4 Verbrauchsmaterial für den Proliferationsassay**Tabelle 3-19:** Auflistung der für den Proliferationsassay verwendeten Verbrauchsmaterialien

Artikel	Hersteller	Katalog-Nr.
Rotiszint Eco Plus Szintillationscocktail	Roth	0016.3
Szintillationsgefäße	Thermo Scientific	
³[H]-Thymidin	Perkin Elmer	MET027W001MC

3.1.6 Antikörper

Tabelle 3-20: Übersicht über die für Western Blot verwendeten Antikörper und ihrer Verdünnungen

Antikörper (Bindestelle)	Hersteller	Katalog-Nr.	Verdünnung des Primärantikörpers	Verdünnung des Sekundärantikörpers
α -AKT	Cell Signaling	9272	1:1000	1:40000 (R)
α -Phospho-AKT	Cell Signaling	2355	1:1000	1:40000 (R)
α -ERK 1/2 (C16)	Santa Cruz	sc-93	1:1000	1:40000 (R)
α -Phospho-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204)	Santa Cruz	sc-16982-R	1:1000	1:50000 (M)
α -GAPDH (6C5)	Novus	NB 600-502	1:5000	1:50000 (M)
α -SMAD1/5/8 (N18)	Santa Cruz	Sc-6031-R	1:1000	1:40000 (R)
α -Phospho-SMAD1/5/8	Cell Signaling		1:1000	1:40000 (R)
α -Phospho-SMAD2	Cell Signaling	3101	1:500	1:40000 (R)
α -Phospho-SMAD3	Cell Signaling	9520s	1:500	1:40000 (R)
α -SMAD2/3	Cell Signaling	5678	1:1000	1:50000 (M)
α -SMAD2/3	BD Pharmingen		1:1000	
α -p21	BD Pharmingen	556431	1:500	1:50000 (M)
α -p27 (F8)	Santa Cruz	Sc-1641	1:500	1:50000 (M)
Cyclin D1 (H295)	Santa Cruz	Sc-753	1:1000	1:40000 (R)
α -Phospho-GSK-3 β (y216)	BD	612312	1:500	1:50000 (M)
α -Phospho-GSK-3 β (S9)	Cell Signaling	9336	1:1000	1:40000 (R)
α -GSK-3 β	Santa Cruz	sc-377213	1:1000	1:50000 (M)
Goat α -Rabbit (R)	Pierce (Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn), [Bestell-Nr. 31460]			
Rabbit α -Mouse (M)	Sigma-Aldrich, München, [Bestell-Nr. A9044]			
α -Goat (G)	Santa Cruz			

Tabelle 3-21: über die für die Histologischen Färbungen verwendeten Antikörper und ihrer Verdünnungen

Antikörper	Hersteller	Katalog-Nr.	Verdünnung des Primärantikörpers
BMPR2	Santa Cruz	SC-5682	1:20 (G)
p-SMAD1/5/8	Santa Cruz	SC-12353	1:20 (G)

3.1.7 Primer

Tabelle 3-22: Übersicht der in der RT-PCR verwendeten Primer für mRNA aus humanen PASM (Hu) und Rattengewebe (R), sowie deren Produktlänge und Hybridisierungstemperatur (T_h)

mRNA	„Forward“ Sequenz (5'→3')	„Reverse“ Sequenz (5'→3')	Spec.	Prod.- Länge	T _h (°C)
SMAD1	CTTCAGAGCCACCATGAACT	CTAAGAGGCTGTGCTGAGGA	Hu	172	58
SMAD2	ATCAGAGGGTTGGAGAAACC	GCAAAAACCTCCCCACCTAT	Hu	193	58
SMAD4	ATGAATTGGATTCTTTAATAACAGC	TTTTGTGAAGATCAGGCCAC	Hu	165	58
SMAD5	ATCATGAGCTAAAGCCGTTG	AACTGAACCAGAAGGCTGTG	Hu	169	58
SMAD6	CGTGGAGCTGAAGCCCCTGT	CGAGAGTAGGGAGGTGGCGG	Hu		58
SMAD7	CAGACTGTCCAGATGCTGTG	ACAGTAGAGCCTCCCCACTC	Hu	167	58
SMAD8	CTGAAGCCGCTGGAGTGCTG	CTGCGGAACCTGGCCAGGAG	Hu		58
ACVR2A	AAGACCCAGGGAAGTGGATA	TGGTTCTGTCTTTTCCCAA	Hu	189	58
BMPR1A	ATTCGGGCCCCACTTC	TTCTCAAACAGCTTTGACC	Hu	162	58
BMPR1B	ATGAGGGAGATTGTGTGCAT	TGTCCTGGGACTCTGACATT	Hu	181	58
BMPR2	GCCGGTCTACTTCCCATATT	CTTTAAACGCACATAGCCGT	Hu	170	58
BMP2	CCCAGACCACCGTTGGAGA	ACCTGAAGCTCTGCTGAGGTGA	Hu		58
BMP3	CTCCCCAAGTCTTTGATGCC	TGGTACACAGCAAGGCTCAGGA	Hu		58
BMP4	GCCAACACCGTGAGGAGCTT	GCTCCCGGAAGAGCCGAAG	Hu		58
BMP6	GGACAGCGCCTTCTCAACG	GCGGAATTCTGCAGCCGTCA	Hu		58
BMP7	GCCATTTCTCACCAGCGCC	GGAATTCGGCTGCCGTGACA	Hu		58
HMBS	CCCAGCTGCAGAGAAAGTT	ACCCGGTTGTGCCAG	Hu	151	58
ID1	AGCCGAGCTCACTCCGAAC	GTCAAGTGGGCAGGGCGAAG	Hu	184	58
ID2	CTAAGCAGACTTTGCCTT	CATTCAAGTAGGCTTGTGT	Hu		58
ID3	ACGATCGCATCTTGTGTC	CTTGTCTCCCTCAGATCC	Hu		58
Follistatin	AGAGCCTGCTTCCTCTGAG	AGCTGTAGTCCTGGTCTTC	Hu		58
Gremlin1	TCACTCTCGGTCCCGCTGAC	AGGAGAAGCAGGGCTCCAC	Hu		58
Chordin	CGCATCAGTGGACACATTG	TTCTGCAGCAGCATATGAGC	Hu		58
Noggin	TGCCCTGGTGGACCTCATC	CCAGCTCCGCCAGGTCCTC	Hu		58
HPRT	GAGCAGTCAGCCCGC	TAGTCCATGAGGAATAAACACCCCT	Hu		58
Myh6	CGGACACTGGAGGACCAGGC	GCCTAGCCAGCTCGCCGTTC	R		60
Myh7	ACCGGAGAATCCGGAGCTGGT	CAAGGTGCCCTTGCTGGGG	R		60
Ccnd1	GGAGTGTGGTGGCCGCGATG	GCCTGGCGCAGGCTTGACTC	R		60
ANP	TCAAGCTGCTTCGGGGGTAG	ACCTCTCAGTGGCAATGCGA	R		56
BNP	CAGCTGCCTGGCCCATCACT	GCTCCAGCAGCTTCTGCATCGT	R		59
HPRT	GACTTTGCTTTCCTTGGTCA	AGTCAAGGGCATATCCAACA	R		58
HMBS	CAAGGTTTTAGCATCGCTACCA	ATGTCCGGTAACGGCGGC	R		60

3.1.8 Laborgeräte

BioDoc Analyzer	Biometra, Göttingen
Elektrophoresekammern	Biometra, Göttingen
Entwicklermaschine	AGFA, Mechelen, Belgien
Heizblock Thermostat TM130-6	HLC-Biotech, Bovenden
Homogenisator „Precellys24“	Bertin Technologies, Montigny-le- Bretonneux, Frankreich
Kühlzentrifuge „Biofuge® fresco“	Heraeus/Kendro, Hanau
Leica DMLA Mikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar
Licht-Mikroskop	Hund, Wetzlar
Mikroplattenlesegerät „Infinite® 200“	Tecan, Crailsheim
Mini-Trans-Blot	Bio-Rad, München
Mx3000P® QPCR System	Stratagene
pH-Meter „Inolab“	WTW, Weilheim
Photometer „BioPhotometer“	Eppendorf, Hamburg
Pipetten „Reference®“(variabel)	Eppendorf, Hamburg
Reinstwasseranlage „Direct-Q® 3“	Millipore, Schwalbach
Sicherheitswerkbank „Herasafe“	Heraeus/Kendro, Hanau
Spannungsgerät f.d. Elektrophorese	Biometra und Bio-Rad
Spektrophotometer „ND-1000“	NanoDrop Technologies, Wilmington, USA
Taumelschüttler	Biometra, Göttingen
Thermocycler „T3000“	Biometra, Göttingen
Thermocycler „TGradient“	Biometra, Göttingen
Tischzentrifuge	Hettich, Tuttlingen

Vortexer	VWR
Wärmeschrank	Binder, Tuttlingen
Wasserbad	Medingen
Zellinkubator „HERAcell“	Heraeus/Kendro, Hanau
Zentrifuge „Rotanta 460“	Hettich, Tuttlingen

3.1.9 Verwendete Software

Biodoc Analyze und BioRad Quantity One	(Einlesen und Bearbeitung von Western Blots)
LAS-AF-Lite_2.6.0_7266	(Mikroskopsoftware)
Stratagene MX Pro Software	(Bearbeitung von PCR Daten)
Graph Pad Prism 5	(Erstellung von Grafiken)
Microsoft Office 2007	

3.2 Methoden

3.2.1 Kultivierung von humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASMC)

Die von der Firma Lonza bestellten primären humanen PASMC wurden nach einer kurzen Auftauphase auf einer 10 cm Zellkulturschale in 8 ml auf 37 °C temperiertem SmGm ausgesät. Nachdem die Zellen adhärent waren, wurde das Medium ausgetauscht, um vorhandenes DMSO zu entfernen. Die Inkubation der Zellen fand bei 37 °C und 5 % CO₂-Anteil statt.

Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt, bis die Zellen nahezu konfluent waren. Dies entsprach einer Menge von ca. 1,5 Mio. Zellen pro Zellkulturschale.

3.2.2 Splitten der Zellen

Gesplittet wurden nahezu konfluente Zellen für gewöhnlich in einem Verhältnis 1:3, je nach Versuchsanordnung auch 1:2 oder 1:4.

Zunächst wurde das Medium abgesaugt und die Zellkulturschale mit PBS gewaschen, um Reste des Mediums zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin (10 % in PBS, 2,5 ml je Schale, 37 °C) für 60 sec. inkubiert. Die Reaktion wurde mit einer adäquaten Menge FCS gestoppt, indem dem Trypsin durch die FCS-Zugabe eine Vielzahl an alternativen Substraten zur Verfügung gestellt wurde. Die angelösten Zellen wurden mit einer Pipette von der Platte gewaschen und in einem 50 ml Falcon Tube bei 1000 rpm für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in Medium resuspendiert. Schließlich wurden die Zellen auf neue Zellkulturschalen verteilt. Für Versuche verwendet wurden Zellen in den Passagen 6 und 7, wobei die Zellen je nach Versuchsanordnung auf 10 cm Zellkulturplatten (Proteinisolation und Western Blot), 6-Well-Platten (RNA-Isolation und PCR) oder 48-Well-Platten (Proliferations- und Scratch-Assay) ausgesät wurden.

3.2.3 Stimulation der Zellen

Vor jeder Stimulation wurden die nahezu konfluenten Zellen für 24 h mit SMBm, also serumfrei inkubiert. Danach erfolgte die Stimulation mit dem jeweiligen Medium, in dem ein oder mehrere Inhibitoren oder Enzymsubstratanaloga beigefügt waren. Wurden Inhibitoren verwendet, deren „Stock“ Lösung nicht mit Wasser hergestellt werden konnte, so wurde bei allen anderen Proben des Versuchsansatzes dieselbe Menge des Lösungsmittels hinzugegeben.

Die Dauer der Stimulation war abhängig von dem Material, das untersucht werden sollte. Für RNA-Extraktion, die Analyse der Zell-Zyklus-Marker (auf Proteinebene) und Proliferationsmessungen lag

die Stimulationsdauer bei 24 h, für Untersuchungen zu Proteinphosphorylierungen mittels Western Blot wurde 30 min stimuliert. Die Inkubationszeit während des Scratch-Assays betrug 7 h, wobei zu berücksichtigen ist, daß hier die Zellen im zeitlichen Verlauf direkt ab Stimulationsbeginn analysiert wurden.

3.2.4 Western Blot

Mittels des Western Blots wurden Proteinkonzentrationen oder deren Phosphorylierungsanteil quantitativ verglichen. Um sicherzustellen, daß die einzelnen Proben identische Gesamtproteinmengen enthielten, wurde jeder Ansatz mit einem Protein gleichgesetzt, welches durch die Versuchsbedingungen nicht beeinflusst wurde. In diesem Fall wurde als „House Keeper“ die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Dieses Enzym ist normalerweise verantwortlich für die Katalysierung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat und zeigt eine gleichmäßige Expression unabhängig der hier verwendeten Inhibitoren.

3.2.4.1 Vorbereitung der Proben

Nach erfolgter Stimulation der Zellen (Abschnitt 3.2.3) wurden die Zellkulturplatten mit PBS gewaschen. Nachdem der Waschpuffer vollständig entfernt wurde, wurden auf jeder Platte 200 µl RIPA-Puffer verteilt und die Zellen für 10 min auf Eis lysiert. Anschließend wurden die lysierten Zellen mit einem Zellschaber abgeschabt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach weiteren 20-30 min auf Eis und mehrfachem Vortexen wurden die Zelltrümmer bei 20 min, 13000 rpm und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Mittels des BioRad DC Protein Assays wurde die Konzentration der einzelnen Proben bestimmt und aneinander angeglichen. Jede der Proben wurde dann mit 1/4 ihres Volumens 5-fach SDS Probenpuffer versetzt und dann für 10 min bei 100 °C denaturiert.

3.2.4.2 Gelelektrophorese, Blotting und Antikörperhybridisierung

Zum Auftrennen der Proben wurde ein 10 %iges SDS-Polyacrylamidgel mit einem 6 %igen Sammelgel in einer 7x9 cm Biometra Gelkammer verwendet (Zusammensetzung siehe Tabelle 3-5). Die Polymerisationsdauer des Trenngels betrug 20 min, das Sammelgel wurde mindestens 30 min auspolymerisiert.

Nach dem Auspolymerisieren wurden die Proben geladen und bei 100 V im Sammelgel, bzw. 130 V im Trenngel aufgetrennt. Zur Größenorientierung wurde ein Full Range Rainbow Marker verwendet.

Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine mittels des Biometra Tank-Blot-Systems auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Die Blottingdauer betrug 60 min bei 100 V. Anschließend konnte die Membran, um die Proteine sichtbar zu machen, mit Panceaurot angefärbt werden. Nun wurden die noch unbesetzten Bindestellen mit 5 % Milch in TBST für 1 h geblockt. Zur Hybridisierung wurde der Primärantikörper in 5 % Milch/TBST gelöst. Die Membran wurde hierfür mit dem Antikörper für ca. 30 min auf dem Schüttler, dann über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Konzentrationen der einzelnen Antikörperverdünnungen sind Tabelle 3-20 zu entnehmen.

Bevor mit dem Sekundärantikörper hybridisiert werden konnte, wurde die Membran für 3x 5 min mit TBST gewaschen. Die Sekundärantikörperhybridisierung erfolgte für 1 h, gefolgt von weiteren 3x5 min Waschen mit TBST. Anstelle von Milchpulver wurde in Ausnahmefällen auch BSA zum Blocken und bei der Antikörperhybridisierung verwendet.

Als Lumineszenzlösung wurden das ECL Kit (GE Healthcare) oder Luminata Forte (Millipore) verwendet, die beide in Anwendung und Ergebnis nahezu identisch waren. Durch hochkant stellen der Membran wurde restliches TBST ablaufen gelassen, danach wurden 1 ml bis 1,5 ml der Lumineszenzlösung auf die Membran gegeben und für 5 min im Dunkeln inkubiert. Die Membran wurde nach kurzem Abtropfen in Folie eingeschlagen und in einer Röntgenfilmkassette mit einem normalen (Agfa) oder hochsensitiven Film (GE Healthcare) aufgelegt. Zur Entwicklung wurde der Entwicklungsautomat Agfa Curix 60 verwendet.

Die Röntgenbilder wurden im Biometra Western Scanner „BioDoc“ fotografiert, digitalisiert und anschließend mit der Software „Biodoc Analyze“ ausgewertet.

3.2.4.3 Stripping

Um die bereits verwendeten Membranen mit einem anderen Antikörper zu hybridisieren, wurden diese gestrippt. Hierfür wurde eine Membran nach dem Abschluß des Entwickelns erneut dreimal für je 5 min mit TBST gewaschen und danach mit Stripping Puffer inkubiert. Dafür standen zwei verschiedene Methoden zur Auswahl:

- a. Die β -Mercaptoethanol-Methode, bei der die Membran für 30-40 min unter Schwenken bei 60 °C im β -Mercaptoethanol-Stripping-Puffer inkubiert wurde
- b. Die HCL-Methode, bei der die Membran im HCL-Glycerin-Stripping-Puffer für 105-120 min bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert wurde

Bei beiden Methoden wurde die Membran nach erfolgtem Strippen dreimal mit TBST gewaschen und anschließend für 1 h mit 5 % Milch in TBST geblockt, bevor sie erneut mit einem Primärantikörper inkubiert werden konnte. Da durch das Strippen auch ein Teil der Proteine auf der Membran verloren geht, wurde bei der Hybridisierung außerdem darauf geachtet, den ersten Durchlauf mit einem schwach bindenden AK durchzuführen (z.B. p-AKT), nach dem Strippen einen jeweils stärkeren AK zu verwenden (z.B. AKT, schließlich GAPDH).

3.2.5 PCR, Primer Designing und RNA-Isolation

Mittels der Reversen-Transkriptase-Real-Time PCR wurde untersucht, welche Stoffwechselwege durch die verschiedenen Stimulationen aktiviert bzw. deaktiviert wurden. Dies geschah indirekt über die verschiedenen mRNA Levels, deren Produkte (u.a. Rezeptoren, Zellzyklusindikatoren oder Signalproteine) in den jeweiligen Stoffwechselwegen involviert waren.

3.2.5.1 Primer designing

Alle Primer wurden ausschließlich für eine Annealingtemperatur von 58 °C designed. Zunächst wurde in NCBI/Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) die jeweilige DNA Sequenz geöffnet. Für die nächsten Schritte wurde das „Primer Designing Tool“ von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) verwendet. Aus der DNA Sequenz wurden der letzte Bereich vor, sowie der erste Bereich nach demselben Intron in das Primer Designing Tool kopiert. Beide Sequenzen sollten insgesamt eine Länge von ca. 200-300 Basen aufweisen. Diese Länge stellte sicher, daß das Produkt bei einer Mindestlänge von 150 Basen auf jeden Fall intronübergreifend sein würde. Danach wurden Primersequenzen mit folgender Konfiguration erstellt:

PCR Produkt Größe (Basen): min 150 max 200

Primer-Schmelztemperatur: min 57 °C opt. 58 °C max. 60 °C

Organismus: nach Bedarf *homo sapiens* oder *rattus norvegicus*

Sämtliche anderen Konfigurationsmöglichkeiten wurden bei den Standardwerten belassen.

Von den erhaltenen Primerpaaren wurde ein intronübergreifendes Paar ausgewählt, welches anschließend mittels des Primer Designing Tools mit der „FASTA“ mRNA Sequenz

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) des jeweiligen Gens verglichen wurde. Sollte das Primerpaar nicht in der Sequenz gefunden werden, wurde der letzte Schritt mit einem anderen Primerpaar wiederholt.

Es wurden ausschließlich intronübergreifende Primerpaare verwendet, um auszuschließen, daß auch ungespleißte prä-mRNAs in der späteren PCR amplifiziert werden können. Diese würden ein deutlich längeres Segment zwischen den Primern aufweisen. Bei einer durchgeführten PCR würde aber wegen des kurzen Zeitfensters für die Amplifikationsphase abgebrochen, bevor diese Sequenz abgeschlossen wäre. Daher würden nur die kurzen, „fertig“ gespleißten mRNA Sequenzen (bzw. nach cDNA Synthese deren komplementäre DNA Sequenzen) mit jedem Zyklus verdoppelt.

Um schließlich festzustellen, daß das ausgewählte Primerpaar nur einmal je Organismus vorkommt, wurde die Sequenz jedes einzelnen Primers mit dem gesamten Genom über Nucleotide Blast! (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?PAGE=Nucleotides>) verglichen.

3.2.5.2 Isolation von Ribonukleinsäuren (RNA)

Für die Isolation von RNA aus Gewebe wurden 50-100 mg Gewebe in 1 ml Trizol in einem RNase-freien Schraubdeckeltube im Ribolyzer zerkleinert.

Für die Isolation aus Zellkulturen wurde die Zellkulturschale mit PBS gewaschen und 1 ml Trizol auf den Zellen verteilt. Nach 2-3 min Inkubationszeit wurde dann mit einem Zellschaber abgeschabt und das Zelllysate in ein RNase-freies Reagenzgefäß überführt.

Nach 10 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die Proben 10 min bei 10500 rpm und 4 °C zentrifugiert, um die Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde in ein neues RNase-freies Reagenzgefäß überführt. Zu den jeweils 1 ml Trizol wurden 200 µl Chloroform in das Reaktionsgefäß gegeben und durch Schütteln gemischt. Nach weiteren 10 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde für 15 min bei 10500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die wässrige obere Phase wurde in ein neues RNasefreies Reaktionsgefäß überführt und anschließend mit 500 µl Isopropanol versetzt. Nach weiteren 10 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde erneut für 15 min bei 10500 rpm und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das RNA-Pellet wurde mit 1 ml 75 % EtOH gewaschen und der Überstand nach 5 min Abzentrifugieren bei 10500 rpm und 4 °C verworfen. Das Pellet wurde für 20-30 min getrocknet und schließlich in 25-30 µl (bei Zellkulturisolation) bzw. 50-70 µl (bei Gewebeisolation) DEPC-behandeltem Wasser bei 55 °C gelöst.

Die Konzentration wurde anschließend bei 260 nm im Nanodrop bestimmt.

3.2.5.3 cDNA Synthese

Zur cDNA Synthese wurde ausschließlich das Improm II Reverse-Transkriptase-Kit von Promega verwendet. Die Synthese erfolgte in zwei Schritten. Im ersten Schritt wurden je 8 µl RNA mit einer Konzentration von 0,1 µg/µl mit 2 µl Oligo(dT)15-Primer (500 µg/ml) gemischt und für 6 min in einer PCR Maschine auf 70 °C erhitzt. Nach dieser Annealingphase wurden zusätzlich je Ansatz

8 µl	Reaktionspuffer [5x]
4 µl	MgCl ₂ [25 mM]
2 µl	dNTP-Mix [10 mM]
1 µl	Ribonuklease-Inhibitor [40 U/µl]
2 µl	Reverse Transkriptase
13 µl	DEPC-behandeltes Wasser

hinzugefügt, was ein Endvolumen von 40 µl je Ansatz ergab. Die Temperaturkonfiguration für den zweiten Schritt betrug 5 min bei 25 °C, 1 h bei 42 °C und anschließend 15 min bei 70 °C.

3.2.5.4 Real-Time PCR

Für die Real-Time PCR wurde entweder das Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG Kit von Invitrogen oder der iTaq Universal SYBR Green Supermix von BioRad verwendet. Beide Kits unterschieden sich in der Anwendung nicht, lediglich der Mastermix war bei BioRad schon vorgefertigt, während er von Invitrogen erst aus den einzelnen Komponenten gemischt werden mußte (siehe Tabelle 3-13). Durchgeführt wurde die PCR im Stratagene MX 3000P, wobei jede Probe doppelt angesetzt wurde, um statistische Abweichungen und Pipettierfehler zu minimieren. Meist wurden hierbei vier identische Proben (aus vier verschiedenen Kulturen) angesetzt, so daß sich pro PCR insgesamt 8 Werte je Stimulation ergaben. In Ausnahmefällen wurden lediglich 3 Proben verwendet, wenn es sich um Vorversuche handelte oder das Plattenlayout nicht mehr Wiederholungen zuließ.

3.2.6 Proliferationsassay (Thymidininkorporationsassay)

Für diesen Assay wurden die humanen PSMC auf einer 48-Well Platte ausgesät. Zu Beginn des Versuchs sollte jedes Well zu ca. 80 % konfluent sein. Nach 24 h Inkubationszeit mit FCS-freiem Basalmedium (SmBm) wurden die Zellen für 20 h stimuliert. Hierfür wurde für gewöhnlich jeder

Ansatz sechsmal (6 Wells) durchgeführt, je nach Anzahl der Inhibitor kombinationen wurden in Ausnahmefällen auch nur fünf oder vier Wiederholungen angesetzt. Nach zwanzig Stunden wurde das Medium gegen ein identisches Medium ausgetauscht, in dem aber zusätzlich 4 µl/10 ml ³[H]-Thymidin beige setzt waren. Zellwachstum und Stimulation erfolgten bei 37 °C.

Nach Ablauf der vier Inkorporationsstunden wurde das Medium abgenommen, die Wells 2x mit 500 µl PBS (4 °C) gewaschen und mit 250 µl Methanol für 15 min bei 4 °C fixiert. Anschließend wurden je 250 µl Trichloressigsäure (TCA) auf das Methanol gegeben und weitere 15 min bei 4 °C inkubiert. Schließlich wurde noch einmal mit je 500 µl dest. H₂O gewaschen und die auf dem Boden der Wells befindliche DNA mittels 250 µl 0,2 M NaOH für 30 min auf dem Schüttler gelöst. Jede der Proben wurde in ein Szintillationsgefäß, welches mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit gefüllt war, überführt und im Szintillationscounter gemessen.

3.2.7 Migrations- „Scratch“ Assay

Um die Migrationsrate von HPASMCs zu bestimmen, wurden diese auf einer 48-Well Platte ausgesät. Sobald die Zellen in jedem einzelnen Well einen zu 100 % konfluenten Zustand erreicht hatten, wurden sie für 24 h mit Basalmedium inkubiert. Anschließend wurde mit Hilfe eines Lineals und einer 1000 µl Pipettenspitze ein gleichmäßiger Streifen mit einer Breite von ca. 0,8 mm längs durch jedes einzelne Well zellfrei geschabt.

Direkt im Anschluss wurden die einzelnen Wells durch mehrmaliges Waschen mit vorgewärmtem PBS von herumtreibenden Zellen und Zelltrümmern befreit und sofort im Anschluß mit dem vorbereiteten Medium versehen. Die 48-Well Platte wurde umgehend in einem Inkubator in ein Lichtmikroskop eingespannt, wo die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ für die nächsten Stunden inkubiert wurden. Um Zellteilungen auszuschließen wurde eine Versuchszeit von 7 Stunden angesetzt, da die verwendeten HPASMCs in dieser Zeit keine vollständige Zellteilung durchführen konnten. Durch das Mikroskop wurden in regelmäßigen Abständen Aufnahmen der freigeschabten Bereiche angefertigt.

Anschließend wurde mittels der Software „Leica LAS AF Lite“ die Breite des zellfreien Bereichs an sieben gleichmäßig über den aufgenommenen Bereich verteilten Stellen zu Beginn des Experiments, sowie nach 7 h gemessen. Das Ergebnis dieser einzelnen Messungen wurde je nach Versuchsansatz auf den Wert der 30 ng/ml PDGF-stimulierten Proben, der 30 ng/ml BMP4 stimulierten Proben, oder der PDGF + BMP4-stimulierten Proben normalisiert, so daß der Durchschnitt dieser 7 Messungen eine Migrationsrate von 100 % ergab.

3.2.8 Histologische Färbungen

Die in Paraffin eingebetteten Rattenlungen wurden am Mikrotom auf eine Dicke von 3 µm geschnitten und auf je einen Objektträger überführt. Anschließend wurden die Schnitte bei 58°C in 3 Schritten für je 10 min in Xylol entparaffiniert. Danach folgten je zwei 5-minütige Bäder in 99,6%, 96%, 70% Alkohol und schließlich in destilliertem Wasser um die Proben zu hydrieren. Als nächstes wurden die Proben für 20 min in Zitratpuffer gekocht, sowie weitere 10 min in heißem Zitratpuffer inkubiert und schließlich für 30 min bei Raumtemperatur abgekühlt. Es folgten zwei weitere Waschschrte für je 5 min in PBS und eine Behandlung mit Proteinase K bei Raumtemperatur, die nach 15 min in dest. H₂O gestoppt wurde. Nach zwei weiteren Waschschrten für je 5 min in PBS wurden die freien Bindestellen der Proben für 60 min in 10% BSA geblockt. Es folgten zwei 5-minütige Waschschrte in PBS und eine Inkubation in Biorace Rodent R für 30 min, gefolgt von drei weiteren Waschschrten in PBS. Anschließend wurden die Schnitte mit den Primärantikörpern BMPR2 bzw. p-SMAD1/5/8 über Nacht hybridisiert. Jeder der Antikörper wurde hierfür im Verhältnis 1:20 in Zytomed Antibody Diluent verdünnt. Am darauffolgenden Tag wurden überschüssige Antikörper in 6 Waschschrten à 20 min in BSA entfernt. Es folgte die Sekundärhybridisierung mit dem Goat on Rodent Polymer Kit für 30 min. Als nächstes wurden die Schnitte vier mal für je 5 min in PBS gewaschen. Nun wurden die Proben zunächst für 15 min im Streptavidin Peroxidase Universal Quick Kit und anschließend im "Goat on Rodent" AP Polymerkit inkubiert. Es folgte eine 10 ± 5-minütige Inkubation durch das Warp Red Chromogen Kit, sowie ein 5-minütiger und ein anschließender 1-minütiger Waschschrte mit dest. H₂O. Nun wurden die Proben für 1-3 min mit Hämatoxylin behandelt, mit H₂O gespült und für ca. 30 sec in PBS inkubiert, bis eine leichte Blaufärbung zu erkennen war. Nach einem weiteren kurzen Spülschrte mit dest. H₂O folgten zwei weitere Waschschrte für je 2 min in 96% Ethanol, zwei Waschschrte für 5 min in Isopropylalkohol, sowie drei mal 5 min in Xylol. Zum Schluß wurden die Proben mit Pertex oder Corbit eingedeckt und konnten unter dem Mikroskop untersucht werden.

4. Ergebnisse

4.1 Direkter Einfluss von Sildenafil und Imatinib auf die Zellteilung von HPASMCs

Im ersten Schritt sollte verglichen werden, wie die Kombination von Sildenafil und Imatinib sich im Vergleich zu einer Einzelbehandlung auf die Proliferationsrate stimulierter HPASMCs auswirkt. Anschließend sollte der Wirkungsweg von Sildenafil ermittelt werden, indem statt einer Hemmung von PDE5, eine im NO- bzw. cGMP-Stoffwechsel nachgeschaltete Proteinkinase direkt aktiviert wird.

4.1.1 Effekt von Sildenafil und Imatinib auf die Zellproliferation von HPASMCs

Für diesen Versuch wurden je 30 000 Zellen in die einzelnen Fächer einer 48-Well Platte ausgesät und nach einer 24-stündigen Inkubationszeit in Basalmedium für weitere 24 h unter unterschiedlichen Bedingungen stimuliert. Für die letzten 4 h wurde dem Zellkulturmedium $^3\text{[H]}$ -Thymidin zugesetzt, um per Szintillationsmessung den Gehalt an neu synthetisierter DNA und damit indirekt die Zellproliferationsrate zu bestimmen. Für die Auswertung wurden die einzelnen Durchläufe normalisiert, wobei die Stimulation mit FCS, bzw. PDGF als 100 % definiert wurde. Um die genauen Auswirkungen der verschiedenen Einzel- sowie Kombinationsbehandlungen in Relation zu setzen, wurde jeder Messwert mit diesem 100 %-Wert, sowie den Proben, die mit 0,5 μM Imatinib behandelt wurden, statistisch verglichen.

Durch die Stimulation mit 5 % fötalem Kälberserum (Abbildung 4-1 A) als auch durch 30 ng/ml PDGF-Stimulation (Abbildung 4-1 B) konnte eine deutliche Steigerung der Proliferationsrate im Vergleich zu serumfrei gesetzten Zellen nachgewiesen werden. Der Effekt durch FCS-Stimulation fiel hierbei mit einer Steigerung auf das 11-fache (Ausgangswert $8,8 \pm 1,2 \%$) der Proliferationsrate der Zellen unter serumfreien Bedingungen deutlich stärker aus, als bei Stimulation mit PDGF (Ausgangswert $24,8 \pm 5,5 \%$). Die Behandlung mit Sildenafil zeigte in beiden Versuchen eine konzentrationsabhängige Abnahme der Proliferationsrate, die unter FCS-Stimulation schon bei 1 μM Sildenafil, jedoch unter PDGF-Stimulation nur bei einer Konzentration von 10 μM Sildenafil eine signifikante Abweichung in Relation zu unbehandelten Zellen erreichte ($51,9 \pm 5,3 \%$ unter FCS-Stimulation, $53,3 \pm 15,9 \%$ bei Stimulation mit PDGF, jeweils bei Behandlung mit 10 μM Sildenafil).

Die Inkubation mit Imatinib führte in beiden Versuchsansätzen zu einer signifikant nachweisbaren, konzentrationsabhängigen Abnahme der Zellproliferationsrate, wobei unter FCS-Stimulation eine Konzentration von 0,5 μM Imatinib die Zellproliferation auf $79,9 \pm 3,4 \%$, die Konzentration von 5 μM

Imatinib die Proliferationsrate auf $45,3 \pm 3,1$ % senkte. Bei einer Stimulation mit PDGF konnte die Proliferationsrate durch die Behandlung mit $0,5 \mu\text{M}$ Imatinib auf $41,6 \pm 5,5$, bzw. mit $5 \mu\text{M}$ Imatinib auf $15,7 \pm 3,7$ % gesenkt werden.

Die Kombination von Sildenafil und Imatinib zeigte in den FCS-stimulierten Versuchsansätzen in Relation zu den Proben, welche nur mit $0,5 \mu\text{M}$ Imatinib behandelt wurden, eine signifikant reduzierte Proliferationsrate (\dagger). Auch in der Kombinationsstimulation war eine konzentrationsabhängige Änderung der Proliferationsrate zu verzeichnen, die bei $10 \mu\text{M}$ Sildenafil und $0,5 \mu\text{M}$ Imatinib unter FCS-Stimulation auf $34,3 \pm 5,3$ % gesenkt werden konnte. Ein solcher Effekt war bei den PDGF- (\ddagger) stimulierten Proben nicht zu erkennen, hier sank die Proliferationsrate bei einer Kombinationsbehandlung mit $10 \mu\text{M}$ Sildenafil und $0,5 \mu\text{M}$ Imatinib auf $23,8 \pm 3,8$ %, was jedoch keine signifikante Veränderung zu den Proben darstellte, die nur mit $0,5 \mu\text{M}$ Imatinib behandelt worden waren.

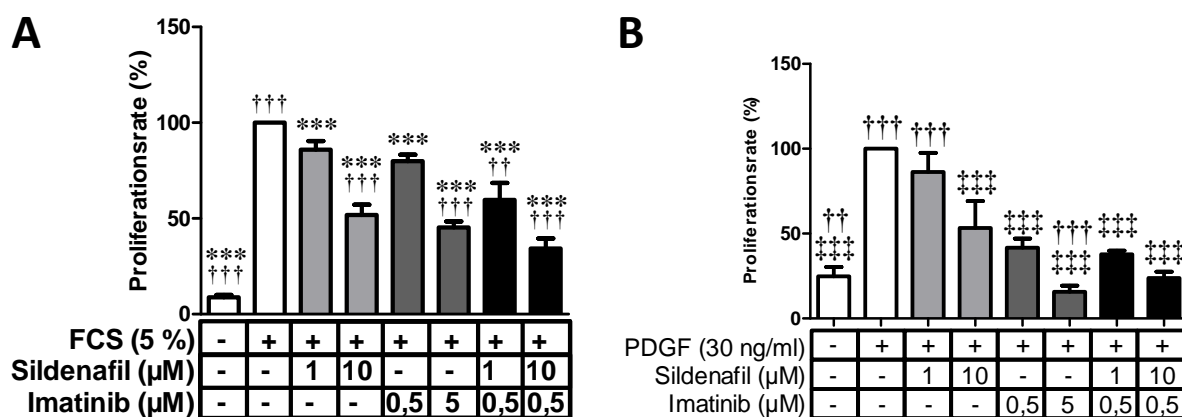


Abbildung 4-1: Der Effekt von Sildenafil, Imatinib, sowie deren Kombination auf die Proliferation von HPASMCs bei 5 % FCS-Stimulation (A) oder 30 ng/ml PDGF-Stimulation (B). Die letzten 4 h der 24-stündigen Stimulation wurden dem Medium $1,5 \mu\text{Ci } ^3\text{H}$ -Thymidin zugesetzt. Der ^3H -Thymidingehalt der Zelllysate wurde durch Szintillationszählung bestimmt. Alle Werte wurden als Mittelwert in Prozent \pm SEM angegeben ($n=6$). * $P < 0,05$ vs. FCS, $\dagger P < 0,05$ vs. $0,5 \mu\text{M}$ Imatinib, $\ddagger P < 0,05$ vs. PDGF.

4.1.2 Die Bestimmung des Wirkungswegs von Sildenafil

Im Anschluss sollte überprüft werden, ob der synergistische Effekt von Sildenafil in Zusammenarbeit mit Imatinib über PKG vermittelt wird. Hierfür wurden anstelle von Sildenafil die PKG-Aktivatoren 8-Br-cGMP bzw. 8-pCPT-cGMP jeweils in zwei verschiedenen Konzentrationen dem Medium zugesetzt, um so die Proteinkinase G, welche Sildenafil im Stoffwechsel nachgeschaltet ist, direkt zu aktivieren.

Beide cGMP-Analoga führten unter FCS-Stimulation zu einer konzentrationsabhängigen Verringerung der Proliferationsrate, die bei einer Konzentration von 10 μM 8-Br-cGMP (Abbildung 4-2 A) mit $71,8 \pm 6,5 \%$, bzw. 200 ng/ml 8-pCPT-cGMP (Abbildung 4-2 B) mit $64,1 \pm 3,8 \%$ signifikante Größen in Relation zu dem Wert stimulierter Zellen erreichte. Die Kombination von 10 μM 8-Br-cGMP und 0,5 μM Imatinib bewirkte mit $55,6 \pm 5,4 \%$ ebenso wie die Kombination von 200 ng/ml 8-pCPT-cGMP und 0,5 μM Imatinib mit $50,2 \pm 2,5 \%$ eine signifikante Reduktion der Proliferationsrate im Vergleich zu den Proben, die mit 0,5 μM Imatinib ($79,9 \pm 3,4 \%$) allein behandelt wurden. Im Vergleich hierzu konnten die Kombinationsbehandlungen mit geringeren Konzentrationen der cGMP Analoga keine nachweisliche Veränderung der Proliferationsrate in Relation zu einer Einzelbehandlung mit 0,5 μM Imatinib bewirken.

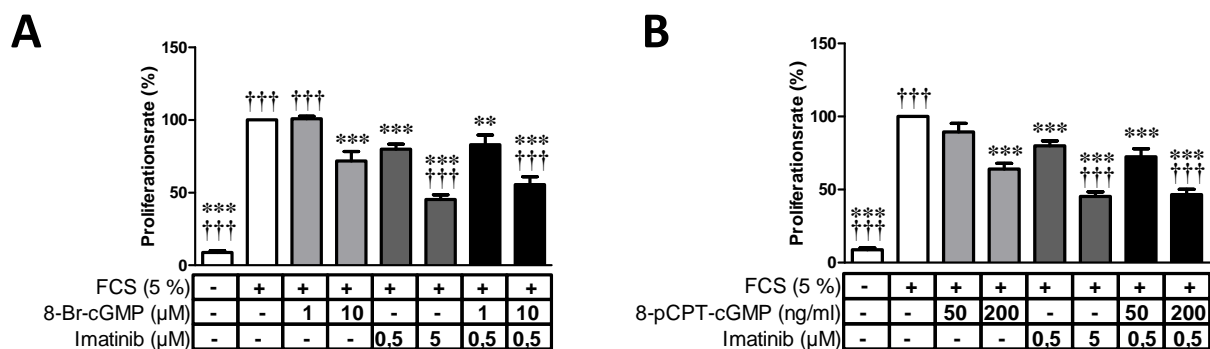


Abbildung 4-2: Auswirkungen von 8-Br-cGMP (A) oder 8-pCPT-cGMP (B) und Imatinib auf die Proliferationsrate von HPASMCs bei FCS-Stimulation. Die Zellen wurden für 20 h mit 5 % FCS stimuliert, die letzten 4 h der Stimulation wurden dem Medium 1.5 μCi ^3H -Thymidin zugesetzt. Der ^3H -Thymidingehalt der Zellysate wurde durch Szintillationszählung bestimmt und in Zählungen/min (cpm) angegeben. Alle Werte wurden als Mittelwert \pm SEM angegeben ($n=6$ (A), $n=4$ (B)). * $P < 0,05$ vs. FCS, $^{\dagger}P < 0,05$ vs. 0,5 μM Imatinib, $^{\ddagger}P < 0,05$ vs. PDGF.

Vergleichbar mit den Proben, die mit FCS stimuliert wurden, ließen die Versuchsansätze mit 30 ng/ml PDGF eine ähnliche Verringerung der Proliferationsrate durch die Behandlung mit den cGMP-Analoga erkennen, die Rate der Zellproliferation konnte durch 10 μM 8-Br-cGMP auf $75,4 \pm 5,6 \%$ durch 200 ng/ml 8-pCPT-cGMP (Abbildung 4-3 B) auf $57,9 \pm 8,5 \%$ gesenkt werden. Während in dem Versuchsaufbau, welcher FCS zur Stimulation verwendete, ein deutlicher synergistischer Effekt durch die Kombinationsbehandlung von Imatinib mit dem jeweiligen cGMP-Analagon auftrat, zeigte sich unter PDGF-Behandlung ein anderes Ergebnis. Die gemeinsame Behandlung der Zellen mit cGMP-Analoga plus 0,5 μM Imatinib führte zu einer Proliferationsrate von $29,4 \pm 3,4 \%$ bei 10 μM 8-Br-cGMP bzw. zu $29,4 \pm 4,1 \%$ bei 200 ng/ml 8-pCPT-cGMP und somit zu keiner signifikanten Reduktion der Zellproliferationsrate im Verhältnis zur Behandlung mit Imatinib allein ($41,6 \pm 5,5 \%$).

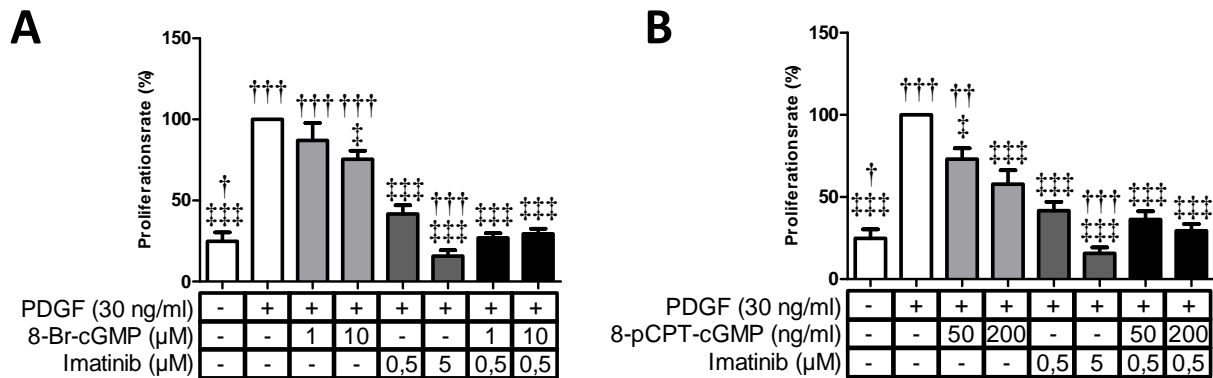


Abbildung 4-3: Einfluss von 8-Br-cGMP (A) bzw. 8-pCPT-cGMP (B) und Imatinib auf die Proliferationsrate von HPASMCs bei PDGF Stimulation (B). Stimuliert wurden die Zellen für 20 h mit 30 ng/ml PDGF, wobei die letzten 4 h der Stimulation dem Medium 1.5 μCi ³[H]-Thymidin zugesetzt wurde. Der ³[H]-Thymidingehalt der Zelllysate wurde durch Szintillationszählung bestimmt und als Mittelwert in Prozent ± SEM angegeben (n=5 (A), n=4 (B)). *P < 0,05 vs. FCS, †P < 0,05 vs. 0,5 μM Imatinib, ‡P < 0,05 vs. PDGF.

4.1.3 Nachweis des synergistischen Effekts von Sildenafil und Imatinib auf Proteinebene über relevante Zellzyklusmarker

Um die Auswirkungen von Sildenafil und Imatinib auf den Zellzyklus auch auf Proteinebene nachzuweisen, sollten im nächsten Schritt die Level der Zellzyklusmarker p21, p27 und Cyclin D1 bei Einfluss von Sildenafil, Imatinib, sowie der Kombination aus beiden untersucht werden. Diese Versuchsreihe wurde mittels Western Blot durchgeführt.

Für jede der Proben wurde eine mit ca. $1,5 \cdot 10^6$ Zellen bewachsene Zellkulturschale für 24 h serumfrei gesetzt und anschließend für weitere 24 h unter entsprechenden Bedingungen (Basalmedium, mit 5 % FCS, mit 1 μM bzw. 10 μM Sildenafil und/oder 0,5 μM bzw. 5 μM Imatinib) inkubiert. Nachdem die Zellen geerntet und mittels Zentrifugation grobe Zelltrümmer entfernt wurden, wurde die Gesamtproteinmenge bestimmt und die einzelnen Proben normalisiert. Anschließend konnten die Proben mit SDS denaturiert, auf ein Gel aufgetragen und nach Blotten und Antikörperhybridisierung mittels eines Röntgenfilms sichtbar gemacht und schließlich durch optische Messung quantifiziert werden. Angegeben wurden die gemessenen Werte als relativer Anteil des zu untersuchenden Proteins in Relation zur Proteinmenge der jeweiligen FCS-stimulierten Probe in Prozent. Diese Probe wurde hierfür als 100 % definiert.

Die Messung der relativen Menge an Cyclin D1 (Abbildung 4-4 B) zeigte einen signifikanten Anstieg der Proteinkonzentration nach FCS-Stimulation auf das Fünffache des Ursprungswerts (Ausgangswert $21,3 \pm 8,3$ %). Eine Behandlung mit Imatinib führte zu einer tendenziellen Abnahme, die jedoch weder bei einer Konzentration von 0,5 μM ($99,3 \pm 5,5$ %) noch bei 5 μM ($74 \pm 3,4$ %) einen

signifikanten Wert erreichte. Die Sildenafil-behandelten Proben zeigten zwar nicht bei einer Behandlung mit 1 μM ($103,6 \pm 13,9 \%$), jedoch bei 10 μM Sildenafil ($61,1 \pm 5,2 \%$) eine signifikante Abnahme des Cyclin D1-Levels im Verhältnis zu den FCS-stimulierten Proben als auch in Relation zu denen, welche mit 0,5 μM Imatinib behandelt wurden. Eine Kombinationsbehandlung mit Sildenafil und Imatinib erreichte bei einer Konzentration von 1 μM Sildenafil und 0,5 μM Imatinib eine nicht-signifikante Abnahme der Cyclin D1-Konzentration auf $70,8 \pm 8,4 \%$. Dieser Effekt wurde durch eine erhöhte Sildenafilkonzentration in der Kombinationsbehandlung verstärkt ($31,5 \pm 6,9 \%$), was eine signifikante Reduktion der Proteinkonzentration in Relation zu FCS-stimulierten als auch Imatinib-behandelten Proben bedeutet.

Die Analyse der p21-Proteinmenge (Abbildung 4-4 C) zeigte bei FCS-Stimulation einen signifikanten Anstieg auf die fast zweifache Menge des Ausgangswertes von $58,1 \pm 12,9 \%$. Eine Behandlung mit Sildenafil als auch mit Imatinib führte zu einer Verringerung des Proteinlevels, wobei dieser Wert lediglich bei 10 μM Sildenafil ($71,5 \pm 9,0 \%$) bzw. 5 μM Imatinib ($71,7 \pm 8,0 \%$) eine signifikante Veränderung in Relation zu den FCS-stimulierten Proben bedeutete. Diese Reduktion trat in den Proben, welche eine Kombinationsbehandlung mit Sildenafil und Imatinib erhielten deutlich stärker hervor. Bei einer Konzentration von 1 μM Sildenafil und 0,5 μM Imatinib konnte im Gegensatz zu den Einzelbehandlungen eine signifikante Reduktion der Proteinkonzentration im Verhältnis zu stimulierten Zellen erfasst werden. Bei einer Erhöhung der Konzentration auf 10 μM Sildenafil und 0,5 μM Imatinib zeigte sich mit einem Wert von $46,8 \pm 7,3 \%$ zusätzlich eine signifikante Reduktion des p21-Proteinlevels in Relation zu den Proben, die ausschließlich mit 0,5 μM Imatinib behandelt wurden.

Ein Vergleich der Menge an p27-Protein (Abbildung 4-4 D) verursachte eine nicht-signifikante Reduktion durch FCS-Stimulation auf etwa die Hälfte der Konzentration der Proben, die unter serumfreien Bedingungen gehalten wurden (Ausgangswert: $192,7 \pm 46,5 \%$). Die Stimulation mit Sildenafil, Imatinib, als auch die Kombination beider Substanzen zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die p27-Proteinkonzentration in den untersuchten Proben.

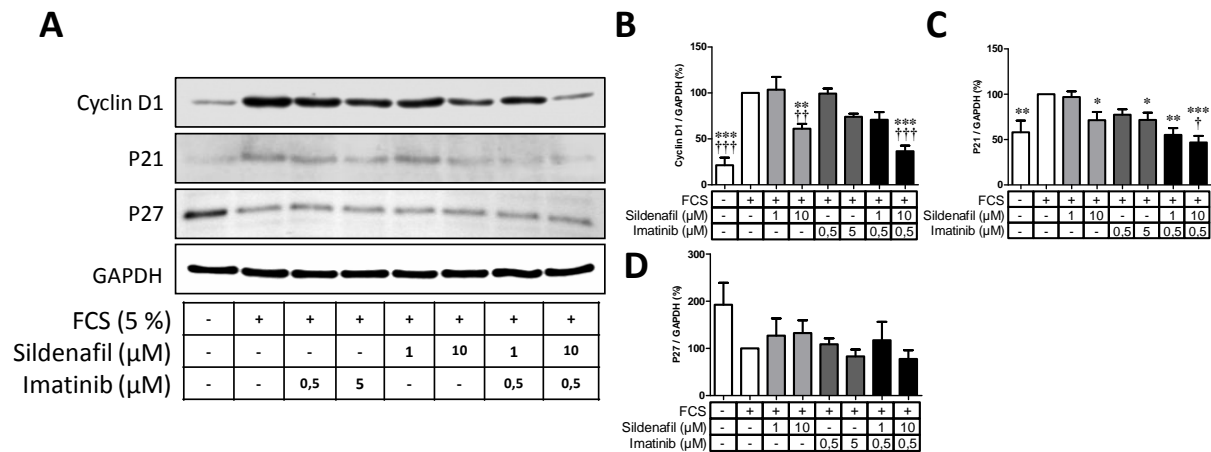


Abbildung 4-4: Auswirkungen der Kombination von Sildenafil und Imatinib auf die Proteinexpression der Zellzyklusmarker Cyclin D1 (B), p21 (C) und p27 (D), angegeben als Mittelwert in Prozent ± SEM. Nach 24 h Inkubation unter serumfreien Bedingungen wurden PASMCs für 24 h mit Sildenafil (1 μM bzw. 10 μM) oder Imatinib (0,5 μM bzw. 5 μM) oder einer Kombination aus beiden (1 μM bzw. 10 μM Sildenafil und 0,5 μM Imatinib) stimuliert. Anschließend wurde mittels Western Blot die relative Konzentration der Zellzyklusmarker bestimmt. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet. . [†]P < 0,05 vs. 0,5 μM Imatinib, *P < 0,05 vs. 5 % FCS (n=6 {C}, n=5 {B, D})

4.2 Auswirkungen der Kombination von Sildenafil und Imatinib auf humane, pulmonalarterielle Muskelzellen

Im folgenden Kapitel sollen die Auswirkungen der Kombination von Sildenafil und Imatinib auf die Aktivierung von SMAD-Komplexen, sowie proliferationsassoziierter Kinasen analysiert werden. Desweiteren soll eine Stimulation mit BMP4 einen Vergleich mittels direkter Aktivierung des SMAD-Signalwegs liefern und die Auswirkungen der Sildenafil-Imatinib-Behandlung, als auch der direkten Aktivierung des SMAD-Signalwegs auf RNA-Ebene, sowie die Zellmotilität bestimmt werden.

4.2.1 Einfluss der Kombination von Sildenafil und Imatinib auf Proteinphosphorylierung von SMADs und assoziierten Kinasen

Nach den Untersuchungen zur direkten Wirkungsweise des Sildenafils und des Einflusses der Kombination von Sildenafil und Imatinib auf die Zellproliferation soll nun geklärt werden, welchen Einfluss beide Medikamente auf den SMAD Signalweg selbst ausüben. Zudem sollen in diesem Schritt Veränderungen analysiert werden, die die Aktivität proliferationsassoziierter Kinasen beeinflussen. Ausgewählt wurden hierfür der SMAD1/5/8 Komplex, sowie p-SMAD3 aus dem antagonistischen TGF-β Signalweg, zudem AKT (auch Proteinkinase B), die "extracellular-signal regulated kinase" (ERK) und die Glycogen Synthase Kinase 3 beta (GSK 3-β). Untersucht wurden die Phosphorylierungen dieser SMADs und Kinasen mittels Western Blot.

Für jede der Proben wurde eine mit ca. $1,5 \cdot 10^6$ Zellen bewachsene Zellkulturschale für 24 h serumfrei gesetzt und anschließend für 30 min unter verschiedenen Bedingungen inkubiert. Hierfür wurden die Proben neben einer Stimulation mit 5% FCS (Abbildung 4-5) oder 30 ng/ml PDGF (Abbildung 4-6) mit 1 μ M bzw. 10 μ M Sildenafil und/oder 0,5 μ M bzw. 5 μ M Imatinib behandelt. Nachdem die Zellen geerntet und mittels Zentrifugation grobe Zelltrümmer beseitigt wurden, wurde die Gesamtproteinmenge bestimmt und die einzelnen Proben normalisiert. Anschließend folgte eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, Blotting, Blocking und eine Hybridisierung mit Primär- und Sekundärantikörpern. Schließlich wurden die Proteinmengen mittels eines Röntgenfilms sichtbar gemacht und optisch quantifiziert.

Die Analyse der SMAD1/5/8-Phosphorylierung (Abbildung 4-5 B) zeigte nach 30-minütiger Stimulation mit 5 % FCS einen signifikanten Anstieg des Phosphorylierungsgrades auf den zehnfachen Wert der Proteinphosphorylierung bei serumfreier Inkubation ($9,5 \pm 3,8$ %). Eine Einzelbehandlung mit Sildenafil (10 μ M Sildenafil: $91,8 \pm 6,5$ %) oder Imatinib (5 μ M Imatinib: $89,3 \pm 8,5$ %) bewirkte keine erkennbare Veränderung des Phosphorylierungsgrades im Vergleich zu FCS-stimulierten Proben. Die Kombinationsbehandlung mit Sildenafil und Imatinib führte hingegen zu einem Anstieg des Phosphorylierungsniveaus. Dieses erreichte jedoch nur bei einer Konzentration von 10 μ M Sildenafil und 0,5 μ M Imatinib ($132,3 \pm 12,6$ %) einen signifikanten Wert im Vergleich zu dem Phosphorylierungsgrad bei FCS-Stimulation, als auch im Vergleich zu den Proben, welche mit 0,5 μ M Imatinib ($100,6 \pm 5,7$ %) allein behandelt wurden.

Ähnlich dem SMAD1/5/8-Komplex zeigte auch das dem antagonistischen TGF- β Signalweg zugeordnete SMAD3 (Abbildung 4-5 C) eine Zunahme des Phosphorylierungsgrades nach 30-minütiger Inkubation mit FCS, die jedoch keine Signifikanz erreichte (Ausgangswert $30,4 \pm 2,1$ %). Ebenso führte weder eine Behandlung mit Sildenafil noch mit Imatinib allein zu einer signifikanten Veränderung des Phosphorylierungsgrades. Lediglich unter Kombinationsbehandlung mit 1 μ M Sildenafil und 0,5 μ M Imatinib ($216 \pm 31,9$ %) war eine signifikante Steigerung des Phosphorylierungsgrades im Verhältnis zu den FCS-stimulierten Proben, als auch zu denen, welche mit 0,5 μ M Imatinib allein ($88,5 \pm 13,2$ %) behandelt wurden, zu messen. Die Phosphorylierung ging in der Kombinationsbehandlung mit 10 μ M Sildenafil und 0,5 μ M Imatinib auf einen Wert von $150,1 \pm 31,5$ % zurück, was keine signifikante Änderung in Relation zu den FCS-stimulierten Proben bedeutet.

Die Auswertung der proliferationsrelevanten Kinasen zeigte einen deutlichen Anstieg des Phosphorylierungsgrades bei AKT (Abbildung 4-5 D) durch die Stimulation mit FCS auf das Vierfache des Wertes unter serumfreien Bedingungen (Ausgangswert $23,9 \pm 4,1$ %). Die Einzelbehandlung mit Sildenafil, sowie die mit Imatinib führte zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme des

Phosphorylierungsgrades, wobei aber lediglich bei 5 μM Imatinib mit $55,9 \pm 12,1 \%$ eine signifikante Reduktion erreicht wurde. Obwohl die Kombination beider Medikamente keine signifikante Veränderung gegenüber der Einzelbehandlung mit 0,5 μM Imatinib ($77,4 \pm 9,0 \%$) erkennen ließ, kann auch hier ein erkennbarer Einfluß durch die Kombination vermutet werden, da eine signifikante Verringerung des Phosphorylierungsgrads im Verhältnis zu dem Level FCS-stimulierter Proben bereits bei einer Kombination von 1 μM Sildenafil und 0,5 μM Imatinib ($59,0 \pm 13,2$) erreicht werden konnte, während die Einzelbehandlung mit jedem der Medikamente bei diesen Konzentrationen keine signifikante Veränderung hervorrief.

Die Analyse der "extracellular-signal regulated Kinase" (ERK, Abbildung 4-5 E) zeigte ähnlich den zuvor beschriebenen Proteinen einen Anstieg des Phosphorylierungslevels durch FCS-Stimulation. Der Wert stieg auf mehr als das Zehnfache des Phosphorylierungsgrades der Proben, die unter FCS-freien Bedingungen gehalten wurden (Ausgangswert $6,1 \pm 3,5 \%$). Während die Behandlung mit Sildenafil bzw. Imatinib allein den Phosphorylierungsgrad von ERK nicht beeinflusste, konnte bei einer Kombinationsbehandlung mit 1 μM Sildenafil und 0,5 μM Imatinib ($138,7 \pm 11,2 \%$) im Verhältnis zu FCS-stimulierten Proben, als auch zu 0,5 μM Imatinib-behandelten Proben ($103,2 \pm 8,5 \%$) eine signifikante Steigerung des ERK-Phosphorylierungsgrades festgestellt werden. Obwohl eine ähnliche Tendenz in den Proben, welche mit 10 μM Sildenafil und 0,5 μM Imatinib ($126,9 \pm 10,6 \%$) behandelt wurden, zu erkennen ist, erreicht hier der Anstieg des Phosphorylierungsgrades keine signifikante Größe.

Als einzige Kinase zeigte die Glykogen synthase Kinase 3 beta (GSK-3 β , Abbildung 4-5 F und G) keinen Anstieg in der Proteinphosphorylierung durch Stimulation mit FCS (Ausgangswert $91,2 \pm 4,7 \%$ an Tyrosinrest 216 bzw. $82,5 \pm 7,5 \%$ an Serinrest 9). Desweiteren ist ebenso durch die Behandlung mit Sildenafil oder Imatinib allein keine Änderung der Proteinphosphorylierung an Serinrest 9 (10 μM Sildenafil: $93,7 \pm 6,6 \%$, 5 μM Imatinib: $111,0 \pm 6,5 \%$), als auch an Tyrosinrest 216 (10 μM Sildenafil: $102,8 \pm 7,9 \%$, 5 μM Imatinib: $94,2 \pm 5,7 \%$) zu verzeichnen. Eine Kombination von Sildenafil und Imatinib hingegen führte zu einer deutlichen Verringerung des Proteinphosphorylierungslevels am Tyrosinrest 216 (10 μM Sildenafil + 0,5 μM Imatinib: $78,8 \pm 8,8 \%$) im Verhältnis zum Proteinphosphorylierungslevel der mit 0,5 μM Imatinib behandelten Proben ($108,9 \pm 3,0 \%$, Abbildung 4-5 F). Schließlich konnte ebenso eine konzentrationsabhängige Steigerung der Proteinphosphorylierung unter Kombinationsbehandlung mit Sildenafil und Imatinib am Serinrest 9 nachgewiesen werden, die bei einer Konzentration von 10 μM Sildenafil plus 0,5 μM Imatinib mit $148 \pm 24,5 \%$ eine signifikante Steigerung im Verhältnis zu den FCS-stimulierten als auch den mit 0,5 μM Imatinib-behandelten Proben ($97,6 \pm 3,5 \%$) messen ließ.

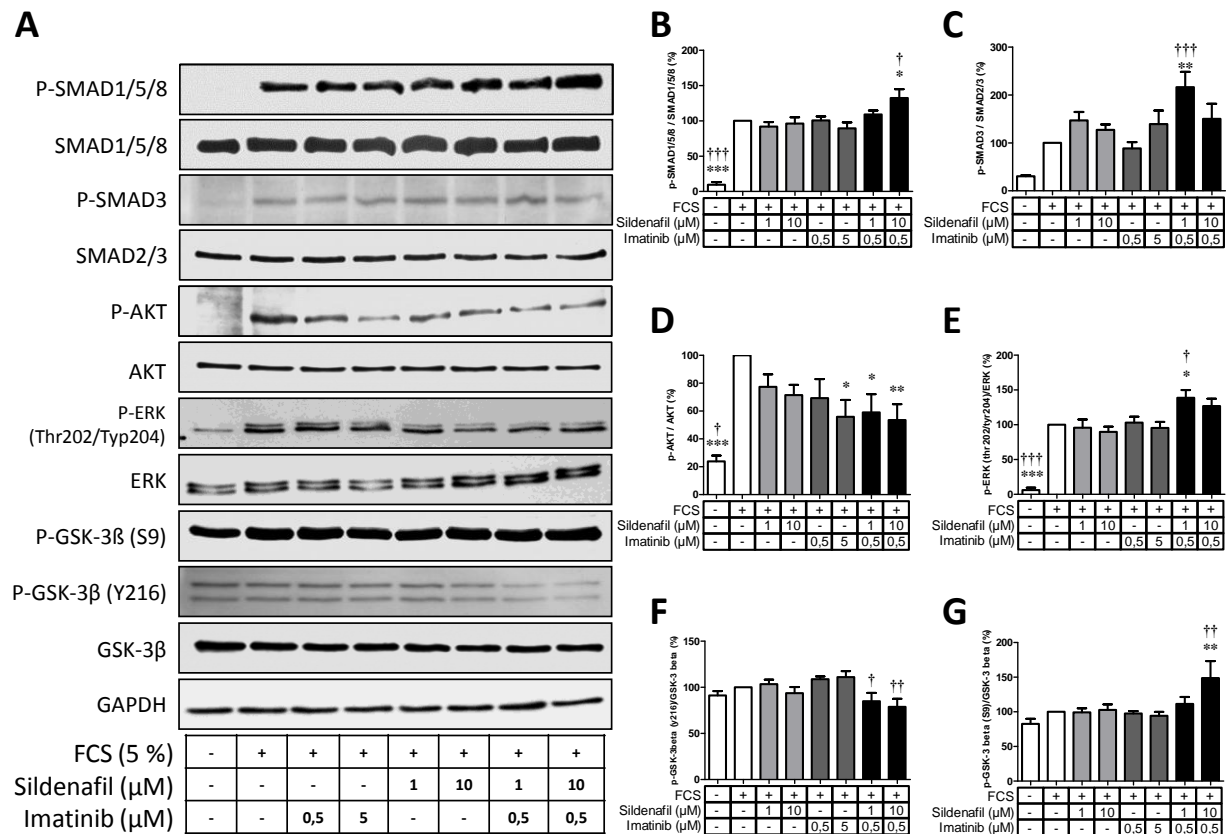


Abbildung 4-5: Auswirkungen der Kombination von Sildenafil und Imatinib auf die Proteinphosphorylierung des SMAD1/5/8 Komplexes (B), des p-SMAD3 bzw. SMAD2/3 Komplexes (C), sowie den Proliferationsrelevanten Kinasen AKT (D), ERK (E) und GSK-3-β an den Phosphorylierungsstellen S9 (F) und Y216 (G) bei Stimulation mit 5 % FCS. Nach 24 h Inkubation unter serumfreien Bedingungen wurden PASMCs für 30 min stimuliert und mit Sildenafil (1 μM oder 10 μM) oder Imatinib (0,5 μM, 5 μM) oder einer Kombination aus beiden (1 μM, bzw. 10 μM Sildenafil und 0,5 μM Imatinib) behandelt. Anschließend wurde mittels Western Blot die relative Proteinphosphorylierung von den oben genannten Mitgliedern des SMAD- bzw. TGF-β-Signalwegs und Kinasen analysiert. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet. [†]P < 0,05 vs. 0,5 μM Imatinib, *P < 0,05 vs. 5 % FCS (n=6 {B, D, E, F}, n=5{G}, n=4 {C})

Im Vergleich zu den Proben, welche mit FCS stimuliert wurden, zeigte der SMAD1/5/8-Phosphorylierungsgrad durch PDGF-Stimulation (Abbildung 4-6) eine nicht signifikante Zunahme (Ausgangswert $54,2 \pm 8,8$ %). Eine Einzelbehandlung mit Sildenafil oder Imatinib zeigte keinen deutlichen Effekt, die Werte der SMAD1/5/8-Phosphorylierung lagen hierbei zwischen $83,7 \pm 12,8$ % und $93,7 \pm 17,6$ %. Auch eine Kombinationsbehandlung mit Sildenafil und 0,5 μM Imatinib zeigte bei 1 μM Sildenafil mit $121,3 \pm 23,8$ % bzw. 10 μM Sildenafil mit $138,3 \pm 30,0$ % lediglich eine marginale Steigerung des Phosphorylierungsgrades. Die Stimulation mit 30 ng/ml BMP4 hingegen führte zu einer signifikanten Steigerung der SMAD1/5/8-Phosphorylierung auf $324,0 \pm 78,0$ %.

Die SMAD3-Phosphorylierung wurde durch die PDGF-Stimulation nicht signifikant beeinflusst (Ausgangswert $111,5 \pm 26,0$ %). Die Behandlung mit Sildenafil, Imatinib oder einer Kombination aus

beiden führte ebenso zu keiner signifikanten Veränderung der Proteinphosphorylierung, die Phosphorylierungslevel schwankten je nach Behandlung zwischen $130,3 \pm 35,8$ und $174,4 \pm 27,2$ %. Auch eine Stimulation mit 30 ng/ml BMP4 sorgte mit einem Proteinphosphorylierungslevel von $160,1 \pm 46,3$ % nicht für eine eindeutige Veränderung.

Durch die Stimulation mit PDGF zeigte die Proteinkinase B (AKT) einen signifikanten Anstieg der Proteinphosphorylierung auf das 33-fache des ursprünglichen Wertes (Ausgangswert $3,4 \pm 1,2$ %). Eine Inkubation mit 1 μ M bzw. 10 μ M Sildenafil führte zu keiner eindeutigen Veränderung der AKT-Phosphorylierung, jedoch konnte durch eine Behandlung mit 0,5 μ M Imatinib das Phosphorylierungslevel signifikant auf $47,7 \pm 13,8$ %, mit 5 μ M Imatinib sogar auf $7,6 \pm 3,1$ % gesenkt werden. Eine Kombinationstherapie mit Sildenafil verhinderte diesen Effekt, so daß bei einer Konzentration von 10 μ M Sildenafil und 0,5 μ M Imatinib mit $99 \pm 19,4$ % keine deutliche Veränderung zu den PDGF-stimulierten Proben zu erkennen war. Die Behandlung mit 30 ng/ml BMP4 zeigte mit $123,9 \pm 25,2$ % ebenfalls keine deutliche Veränderung im AKT-Phosphorylierungslevel.

Die ERK-Proteinphosphorylierung stieg durch die PDGF-Stimulation um den Faktor 4 (Ausgangswert $25,9 \pm 10,3$ %) an. Auch hier führte die Behandlung mit Sildenafil zu keiner signifikanten Veränderung. Die Zugabe von Imatinib verursachte eine signifikante, konzentrationsabhängige Verringerung des ERK-Phosphorylierungsgrades ($20,5 \pm 5,7$ % bei 5 μ M Imatinib). Jedoch konnte eine Kombinationsbehandlung mit 0,5 μ M Imatinib und 1 μ M Sildenafil ($67,3 \pm 7,1$ %) bzw. 10 μ M Sildenafil ($64,7 \pm 5,4$ %) keine erkennbare Veränderung des ERK-Phosphorylierungslevels in Relation zu einer Einzelbehandlung mit 0,5 μ M Imatinib ($69,8 \pm 10,6$ %) bewirken. Auch zeigte sich durch eine Behandlung mit 30 ng/ml BMP4 mit einem Phosphorylierungsgrad von $85,7 \pm 8,7$ % keine deutliche Änderung zu den Werten der Proben, die nur mit PDGF stimuliert wurden.

Der GSK-3 β -Phosphorylierungsgrad wurde durch die Stimulation mit 30 ng/ml PDGF an Serinrest 9 (S9, Ausgangswert $40,1 \pm 14,5$ %), als auch an Tyrosinrest 216 (Y216, Ausgangswert $55,8 \pm 13,8$ %) in etwa verdoppelt, jedoch konnte weder eine Einzelbehandlung mit Imatinib oder Sildenafil, noch eine Kombinationsbehandlung beider Medikamente zu einer signifikanten Veränderung des Phosphorylierungsgrades an den Resten Y216 oder S9 hervorrufen. Ebenso führte an Serinrest 9 (Abbildung 4-6 G) die Stimulation mit 30 ng/ml BMP4 zu keiner Veränderung. Die Phosphorylierungsgrade an Serinrest 9 schwankten während den verschiedenen Behandlungen mit Sildenafil, Imatinib und BMP4 zwischen $100,5 \pm 12,2$ % und $124,4 \pm 11,1$.

Ähnlich zeigte sich der Phosphorylierungsgrad an Tyrosinrest 216 (Abbildung 4-6 F). Weder eine Reduktion des Phosphorylierungsgrades durch eine Kombination von 10 μ M Sildenafil und 0,5 μ M

Imatinib mit einem Wert von $54,3 \pm 11,7 \%$, noch Behandlung mit 30 ng/ml BMP4 mit $53,9 \pm 19,6 \%$ zeigten eine signifikante Änderung des Phosphorylierungsgrades.

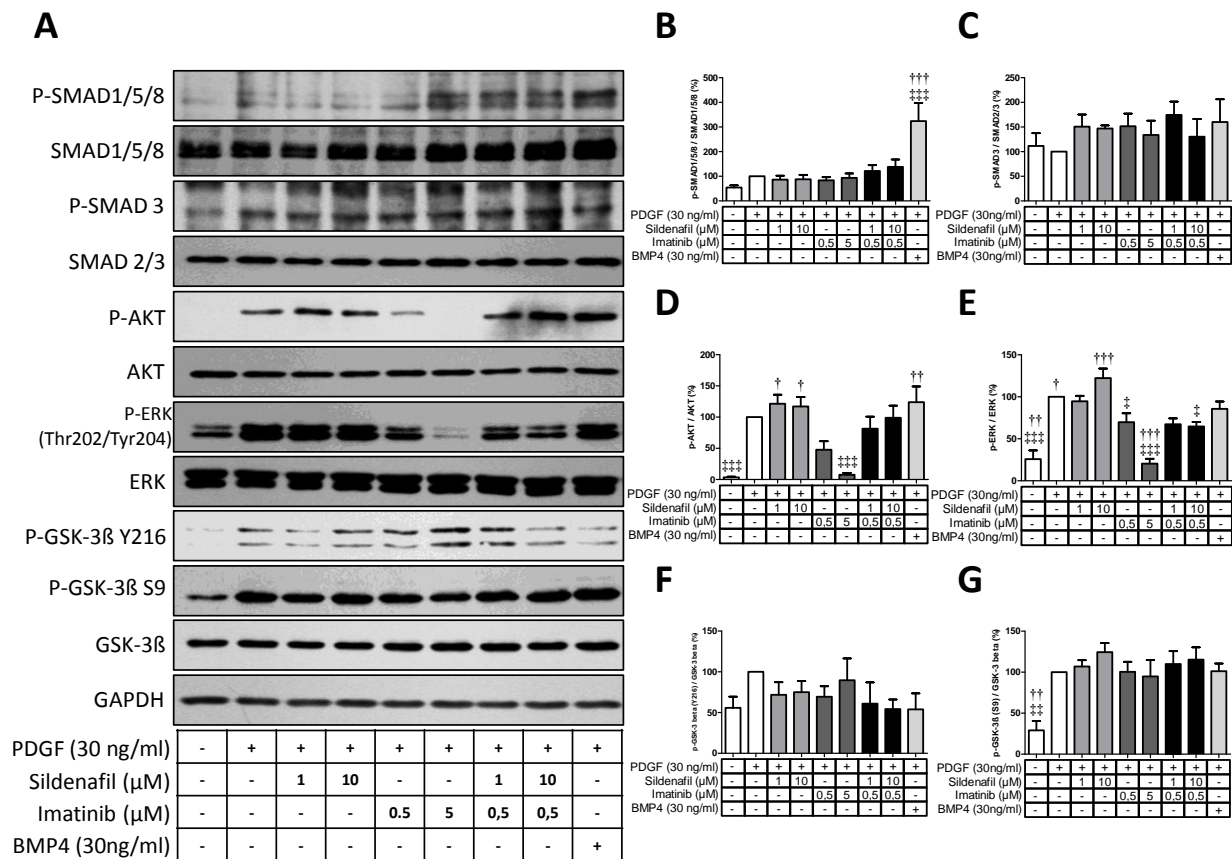


Abbildung 4-6: Auswirkungen der Kombination von Sildenafil und Imatinib auf die Proteinphosphorylierung des SMAD1/5/8 Komplexes (B), des p-SMAD3 bzw. SMAD2/3 Komplexes (C), sowie den Proliferationsrelevanten Kinasen AKT (D), ERK (E) und GSK-3-β S9 (F) und Y216 (G) bei Stimulation mit 30 ng/ml PDGF. Nach 24 h Inkubation unter serumfreien Bedingungen wurden PASCs für 30 min stimuliert und mit Sildenafil (1 μM oder 10 μM) oder Imatinib (0,5 μM, 5 μM) oder einer Kombination aus beiden (1 μM, bzw. 10 μM Sildenafil und 0,5 μM Imatinib) behandelt. Anschließend wurde mittels Western Blot die relative Proteinphosphorylierung von Mitgliedern des SMAD-Signalwegs und nachgeschalteten Proteinen analysiert. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet. Desweiteren wurde der Phosphorylierungsgrad der einzelnen Proteine graphisch in Relation gesetzt. [†]P < 0,05 vs. 0,5 μM Imatinib, [‡]P < 0,05 vs. 30 ng/ml PDGF (n=7 {B, C, E}, n=6 {D, G}, n=5 {F})

4.2.2 Einfluss der Behandlung mit BMP4 auf die Zellproliferation

In den anschließenden Experimenten sollte auf die einzelnen Komponenten des SMAD1/5/8 Signalwegs genauer eingegangen werden. Erster Schritt war die Untersuchung des Einflusses der direkten Stimulation dieses Signalweges auf die Proliferationsrate.

Mittels des Proliferationsassays wurden die Auswirkungen einer gezielten Aktivierung dieses Signalweges durch den Liganden BMP4 aufgezeigt. Die Stimulation der Zellen erfolgte durch PDGF, da

vorangegangene Versuche bei FCS-Stimulation bereits eine deutliche Aktivierung des SMAD-Signalweges nachweisen konnten (siehe Abbildung 4-5 B). Wie schon in den bisherigen Proliferationsassays wurde auch in dieser Versuchsserie nach 24 h unter Basalmedium für weitere 24 h mit 30 ng/ml PDGF stimuliert, wobei zusätzlich zu den erfolgten Behandlungen mit 1 μ M bzw. 10 μ M Sildenafil und/oder 0,5 μ M bzw. 5 μ M Imatinib eine weitere Behandlung mit 30 ng/ml BMP4 erfolgte. Für die letzten 4 h der Stimulation wurde den Proben 3 [H]-Thymidin zugesetzt und schließlich die Proliferationsrate indirekt über die DNA-Synthese mittels Szintillationsmessung bestimmt.

Im Folgenden soll lediglich auf die Stimulation mit BMP4 eingegangen werden, da die Stimulationen mit Sildenafil und/oder Imatinib bereits in Abschnitt 4.1.1 behandelt wurden.

Durch die Behandlung mit 30 ng/ml BMP4 zeigte sich eine signifikante Reduktion der Proliferationsrate in Relation zur Stimulation mit PDGF. Die Proliferationsrate dieser Proben lag mit einem Wert von $62,9 \pm 3,2$ % zwischen der Rate der Proben, die mit 1 μ M Sildenafil ($86,3 \pm 11,3$ %) und der, die bei einer Behandlung mit 10 μ M Sildenafil ($53,3 \pm 15,9$ %) ermittelt wurde.

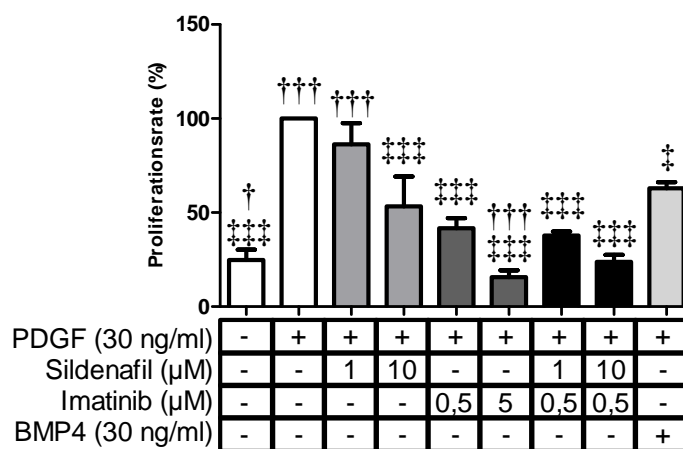


Abbildung 4-7: Die Auswirkungen der Stimulation mit BMP4 auf die Zellproliferation in Relation zur Einzelbehandlung mit Sildenafil, Imatinib oder der Kombinationsbehandlung beider Substanzen. Die letzten 4h der Stimulation wurden dem Medium 1,5 μ Ci 3 [H]-Thymidin zugesetzt. Der 3 [H]-Thymidingehalt der Zelllysate wurde durch Szintillationszählung bestimmt und in Zählungen/min (cpm) angegeben. Alle Werte wurden als Mittelwert \pm SEM angegeben. † P < 0,05 vs. 0,5 μ M Imatinib, ‡ P < 0,05 vs. PDGF. (n=3)

4.2.3 Analyse des Einflusses von Sildenafil und Imatinib auf die RNA-Ebene des SMAD-Signalweges

Um die Auswirkungen von Sildenafil und Imatinib auf RNA-Ebene zu untersuchen, wurden nahezu konfluent bewachsene 6-Well Platten nach einer 24-stündigen Inkubation unter Basalmedium für weitere 24 h mit 30 ng/ml PDGF stimuliert. Zudem wurden die PSMCs mit 1 μ M bzw. 10 μ M Sildenafil und/oder 0,5 μ M bzw. 5 μ M Imatinib behandelt. Die Versuchsserien beinhalteten außerdem eine Versuchsgruppe, die neben PDGF eine Behandlung mit 30 ng/ml BMP4, sowie eine Gruppe, die mit 30 ng/ml BMP4, 10 μ M Sildenafil und 0,5 μ M Imatinib behandelt wurde. Nachdem die RNA mittels der Trizol/Chloroform-Methode isoliert und quantifiziert wurde, erfolgten eine cDNA-Synthese und eine quantitative Real-Time PCR, deren Ergebnisse als $\Delta\Delta$ CT-Werte angegeben wurden. Als Referenz diente die HPRT-mRNA. Der Einfachheit halber werden im folgenden Abschnitt die verschiedenen mRNAs, bzw. deren cDNA mit dem Namen des codierten Proteins bzw. Gens bezeichnet.

Die verwendeten Primer ließen sich in drei Gruppen einordnen: Zunächst sollten die Rezeptoren ACVR2a, BMPR1a, BMPR1b und BMPR2 untersucht werden. Der nächste Schritt war die Analyse der stromabwärts befindlichen SMAD-Proteine, wobei hier die für den antiproliferativen Signalweg verantwortlichen R-SMADs, also SMAD1, SMAD5 und SMAD8, sowie repräsentativ für den antagonistischen TGF- β Signalweg SMAD3 analysiert wurden. Der letzte Schritt dieser Versuchsreihe zielte auf das Produkt des SMAD1/5/8 Signalweges, also dem Inhibitor of DNA-binding Protein 1, -2 und -3 (ID1, ID2 und ID3) ab.

Die Analyse der mRNA von BMPR1a, BMPR1b, BMPR2 und ACVR2a (Abbildung 4-8) lies keine signifikante Veränderung der mRNA Konzentrationen durch eine Behandlung mit 1 μ M bzw. 10 μ M Sildenafil und/oder 0,5 μ M bzw. 5 μ M Imatinib erkennen. Auch die Behandlung mit 30 ng/ml BMP4 oder einer Kombination von BMP4 mit beiden anderen Substanzen zeigte keinen erkennbaren Einfluss. Die Gesamtvarianz der $\Delta\Delta$ CT-Werte lag innerhalb eines Werts von 2, was bedeutete, daß keine Mengenänderung um mehr als den Faktor 4 stattgefunden hat.

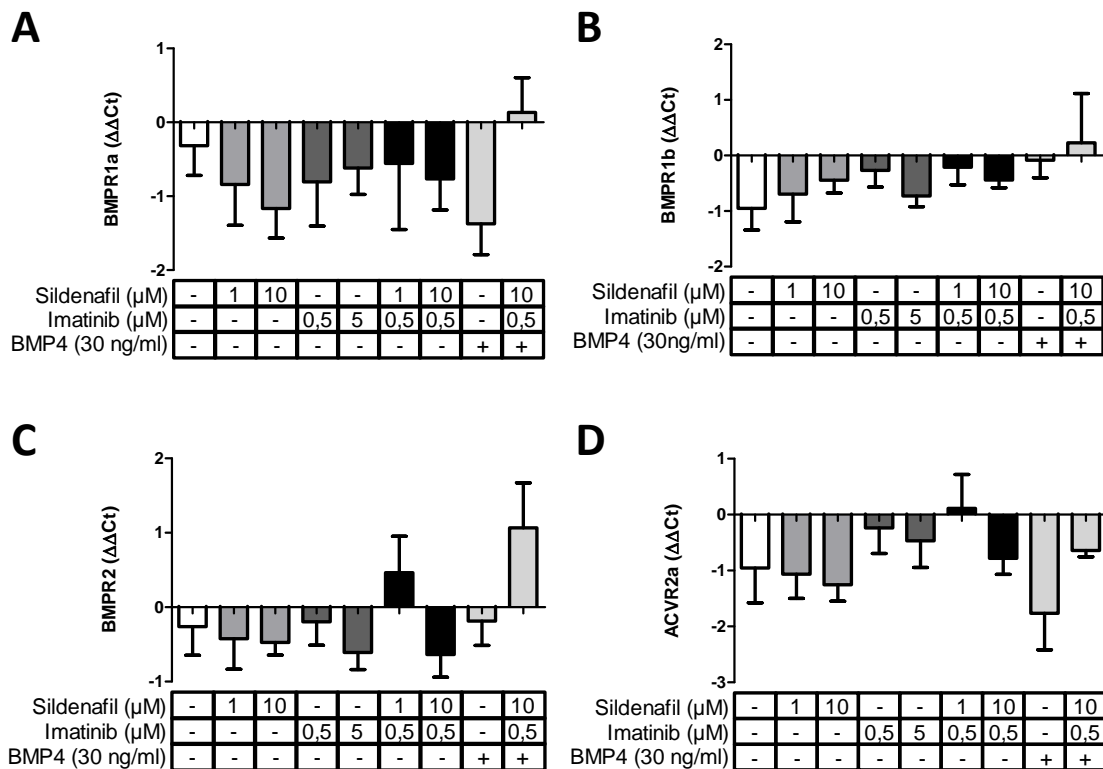


Abbildung 4-8: Quantitative RT Real-Time PCR der Rezeptor-mRNAs für BMPR1a (A), BMPR1b (B), BMPR2 (C) und ACVR2a (D). Nach 24 h Inkubation unter Basalmedium erfolgte eine 24-stündige Stimulation mit 30 ng/ml PDGF, außerdem wurden die Zellen behandelt mit 1 μM bzw. 10 μM Sildenafil, und/oder 0,5 μM bzw. 5 μM Imatinib. Desweiteren wurde je eine Versuchsgruppe mit 30 ng/ml BMP4, sowie einer Kombination aus 30 g/ml BMP4, 10 μM Sildenafil und 0,5 μM Imatinib behandelt. Alle Ergebnisse wurden als $\Delta\Delta CT \pm SEM$ angegeben (n=6).

Die Untersuchung der mRNAs von SMAD1, SMAD5, SMAD8 und SMAD3 (Abbildung 4-8) ließ ähnlich den Werten der Rezeptor-mRNAs keine signifikante Veränderung der mRNA Konzentrationen durch die Behandlung mit Sildenafil, Imatinib oder einer Kombination der beiden Substanzen erkennen. Eine Behandlung mit 30 ng/ml BMP4 oder eine Kombination von BMP4 mit Sildenafil und Imatinib zeigte ebenso keinen erkennbaren Einfluss auf die Konzentrationen dieser mRNAs. Auch hier wurde eine Gesamtvarianz der $\Delta\Delta CT$ -Werte von 2 nicht überschritten.

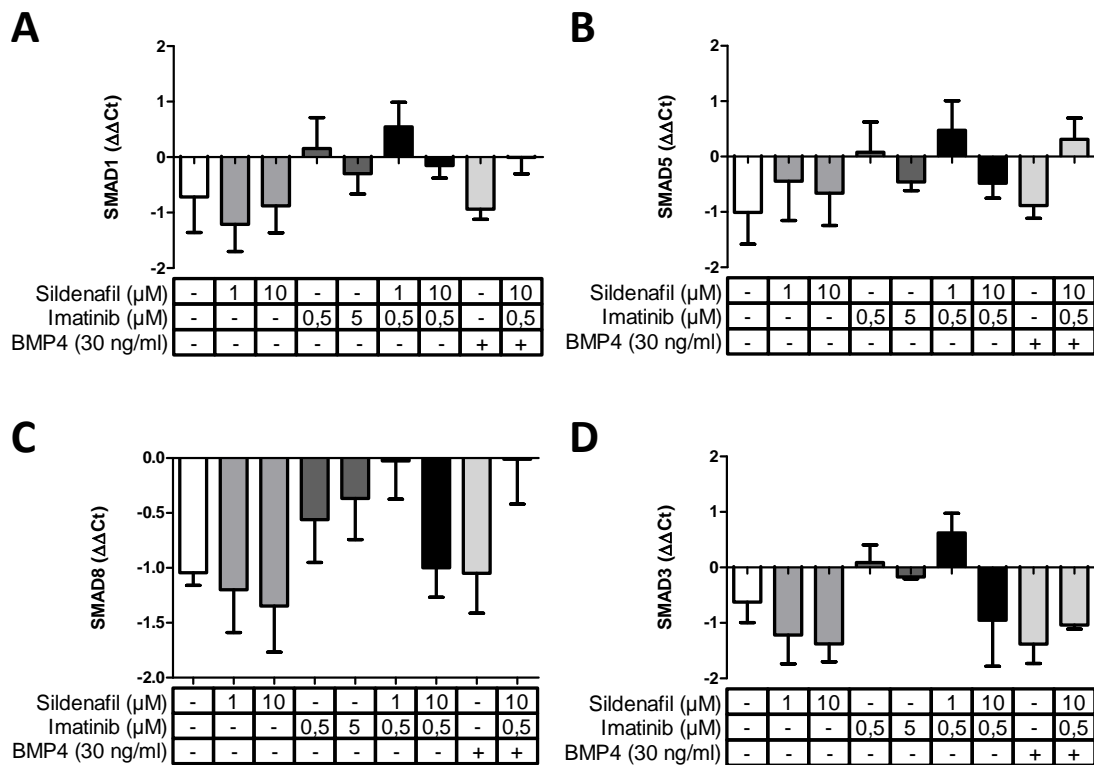


Abbildung 4-9: Quantitative RT Real-Time PCR der R-SMAD-mRNAs für SMAD1 (A), SMAD5 (B), SMAD8 (C) und SMAD3 (D). Nach 24 h Inkubation unter Basalmedium erfolgte eine 24-stündige Stimulation mit 30 ng/ml PDGF, außerdem wurden die Zellen behandelt mit 1 μM bzw. 10 μM Sildenafil, und/oder 0,5 μM bzw. 5 μM Imatinib. Desweiteren wurde je eine Versuchsgruppe mit 30 ng/ml BMP4, sowie einer Kombination aus 30 g/ml BMP4, 10 μM Sildenafil und 0,5 μM Imatinib behandelt. Alle Ergebnisse wurden als $\Delta\Delta Ct \pm SEM$ angegeben (n=6).

Im letzten Schritt sollte auf die Produkte des SMAD-Signalwegs, also die ID1-, ID2- und ID3-mRNA (Abbildung 4-10) eingegangen werden. Auch bei diesen Versuchen führte die Behandlung mit Sildenafil und/oder Imatinib (Ausgangswert $1,1 \pm 0,4$) zu keiner signifikanten Veränderung in der ID1-, ID2- und ID3-mRNA Konzentration.

Jedoch konnte eine Steigerung der ID1-mRNA Konzentration auf einen $\Delta\Delta Ct$ -Wert von $2,1 \pm 0,5$ durch Behandlung der PDGF-stimulierten Proben mit 30 ng/ml BMP4 nachgewiesen werden. Die Zugabe von 10 μM Sildenafil und 0,5 μM Imatinib konnte dieses mRNA-Level signifikant auf einen Wert von $3,0 \pm 1,0$ und damit auf etwa die 4-fache Menge in Relation zur mRNA der 0,5 μM Imatinib-behandelten Proben steigern (Abbildung 4-10 A).

Auch die Untersuchung der ID2-mRNA zeigte eine leicht erhöhte Konzentration bei BMP4-Stimulation, die mit einem Wert von $0,5 \pm 0,6$ nicht signifikant von den anderen Werten abwich. Jedoch erreichte eine kombinierte Behandlung mit BMP4, 10 μM Sildenafil und 0,5 μM Imatinib einen Wert von $1,9 \pm 1,1$, der somit signifikant höher lag, als der PDGF-stimulierter Proben,

sowie der 0,5 μ M Imatinib-stimulierter Proben. Die Steigerung des mRNA-Levels betrug nahezu den 8-fachen Wert der mRNA PDGF-stimulierter Proben, als auch den der Proben, die mit 0,5 μ M Imatinib stimuliert wurden (Abbildung 4-10 B).

Durch eine Stimulation mit 30 ng/ml BMP4 konnte bereits eine signifikante Steigerung ($1,0 \pm 0,3$) der mRNA-Konzentration in Relation zu der ID3-mRNA der PDGF-stimulierten Proben ($-0,5 \pm 0,3$), als auch den Proben, welche mit 0,5 μ M Imatinib ($-0,8 \pm 0,3$) behandelt wurden gemessen werden. Eine Ergänzung der BMP4 Stimulation mit einer Behandlung von 10 μ M Sildenafil und 0,5 μ M Imatinib verstärkte diesen Effekt und führte darüber hinaus zu einer signifikanten Steigerung der mRNA Konzentration in Relation zu den Proben, die mit BMP4 stimuliert wurden, wobei die Konzentration der ID3-mRNA in diesen Proben mit $2,7 \pm 0,8$ etwa den 8-fachen Wert der Proben annahm, die nur mit PDGF oder 0,5 μ M Imatinib behandelt wurden (Abbildung 4-10 C).

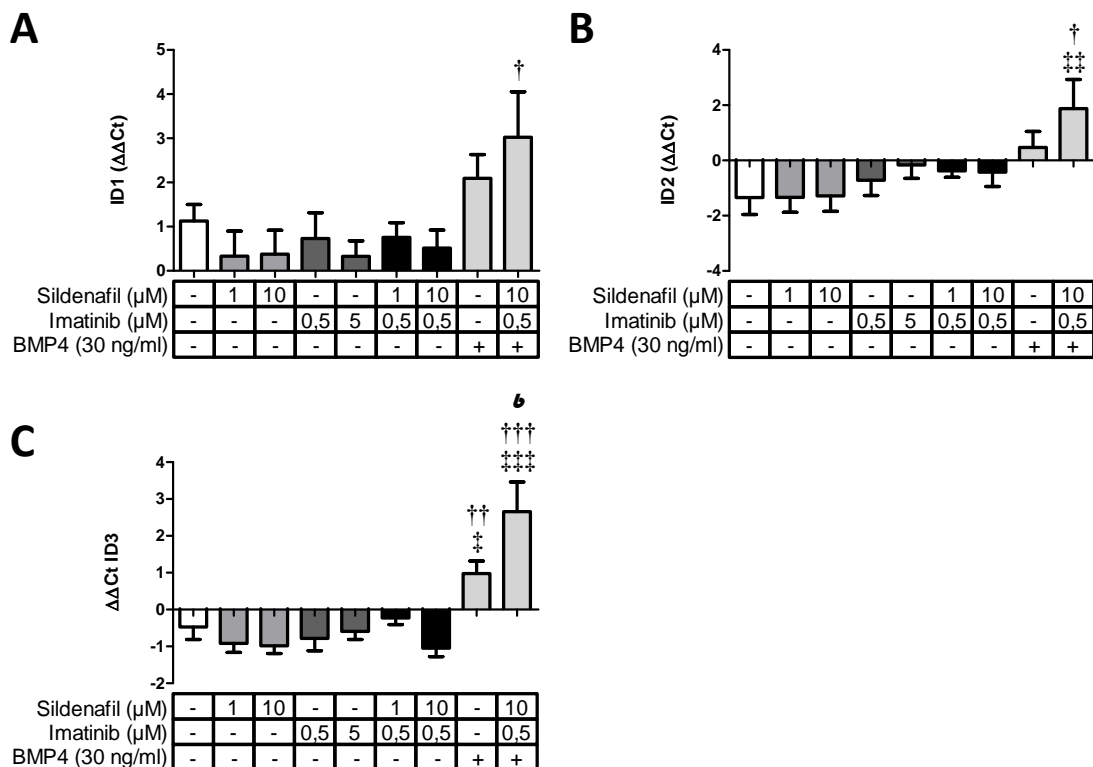


Abbildung 4-10: Quantitative RT Real-Time PCR der mRNAs der SMAD1/5/8 Zielgene ID1 (A), ID2 (B) und ID3 (C). Nach 24 h Inkubation unter Basalmedium erfolgte eine 24-stündige Stimulation mit 30 ng/ml PDGF, außerdem wurden die Zellen behandelt mit 1 μ M bzw. 10 μ M Sildenafil, und/oder 0,5 μ M bzw. 5 μ M Imatinib. Desweiteren wurde je eine Versuchsgruppe mit 30 ng/ml BMP4, sowie einer Kombination aus 30 ng/ml BMP4, 10 μ M Sildenafil und 0,5 μ M Imatinib behandelt. Alle Ergebnisse wurden als $\Delta\Delta Ct \pm SEM$ angegeben (n=6). $^{\dagger}P < 0,05$ vs. 0,5 μ M Imatinib, $^{\ddagger}P < 0,05$ vs. PDGF, $^{\ast}P < 0,05$ vs. 30 ng/ml BMP4.

4.2.4 Auswirkungen der Behandlung mit Sildenafil und/oder Imatinib, sowie der Stimulation des SMAD-Singalweges auf die Zellmotilität pulmonal-arterieller Muskelzellen

Da die *de novo*-Muskularisierung zu den wichtigen Faktoren der PAH zählt, sollte im nächsten Schritt darauf eingegangen werden, inwieweit die Kombination von Sildenafil und Imatinib die Zellmigrationsrate von HPASMCs beeinflusst. Hierfür wurden Zellen in einer 48-Well Platte ausgesät und bei 100%-iger Konfluenz für 24h serumfrei gesetzt. Nachdem in jedem Well ein Bereich von Zellen befreit wurde, wurden die Zellen unter den entsprechenden Medien inkubiert und die Zellmigrationsrate durch vergleichende Messungen des zellfreien Bereichs je zu Beginn des Versuchs, sowie nach 7 std. ermittelt. Die erhaltenen Daten wurden auf die Werte der Proben, die mit PDGF und/oder BMP stimuliert wurden normalisiert, der Mittelwert dieser Proben wurde als 100% definiert. Die Stimulation erfolgte mit 1 μ M und 10 μ M Sildenafil und/oder 0,5 μ M und 5 μ M Imatinib. Alternativ zu Sildenafil wurden identische Versuche mit den PKG Agonisten 8-Br-cGMP (1 μ M und 10 μ M) und 8-pCPT-cGMP (50 ng/ml und 200ng/ml) durchgeführt.

Die Stimulation mit 30 ng/ml PDGF führte zu einer signifikanten Steigerung der Proliferationsrate auf mehr als den doppelten Wert der Zellen, die unter Basalmedium inkubiert wurden (Abbildung 4-11 A, D, G, Ausgangswert $45,0 \pm 8,5$ %). Während die Behandlung mit 5 μ M Imatinib zu einer signifikanten Reduktion der Zellmigrationsrate auf $37,4 \pm 8,6$ % führte, war durch die Behandlung mit Sildenafil keine Veränderung der Zellmotilität erkennbar (Abbildung 4-11 A). Im Gegensatz hierzu führte eine Einzelbehandlung mit den PKG Aktivatoren zu einer signifikanten Reduktion der Zellmigrationsrate in Relation zu einer Einzelbehandlung mit 0,5 μ M Imatinib. Während die Reduktion bei einer Kombination von Imatinib mit 1 μ M 8-Br-cGMP lediglich eine marginale Veränderung ($91,4 \pm 11,1$ %) hervorbrachte, sorgte eine Erhöhung der Konzentration auf 10 μ M 8-Br-cGMP für eine signifikante Reduktion auf $73,0 \pm 6,5$ % (Abbildung 4-11 D). Die Behandlung mit 200 ng/ml 8-pCPT-cGMP führte zur einer Reduktion der Zellbewegung auf $59,2 \pm 4,6$ % (Abbildung 4-11 G).

In den Versuchsansätzen der Kombinationstherapien war eine signifikante Reduktion der Migrationsrate auf $71,7 \pm 6,4$ % durch die Behandlung mit 10 μ M 8-Br-cGMP und 0,5 μ M Imatinib (Abbildung 4-11 D) zu verzeichnen. Ebenso zeigte sich bei der Kombination von 0,5 μ M Imatinib mit 50 ng/ml bzw. 200 ng/ml 8-pCPT-cGMP (Abbildung 4-11 G) eine signifikante Reduktion der Migrationsrate auf $65,7 \pm 14,3$ % bzw. $58,5 \pm 6,9$ %. Obwohl die Kombinationsbehandlung mit Sildenafil und 0,5 μ M Imatinib keine signifikante Abweichung zur Einzelbehandlung mit 0,5 μ M Imatinib aufwies, ist dennoch eine tendenzielle Abnahme der Migrationsrate auf $75,7 \pm 6,8$ % (1 μ M Sildenafil) bzw. $57,8 \pm 6,0$ % (10 μ M Sildenafil) zu erkennen.

Eine kombinierte Stimulation mit 30 ng/ml PDGF und 30 ng/ml BMP4 (Abbildung 4-11 B, E, H) zeigte in Relation zu den Proben, die mit PDGF allein stimuliert wurden, einen vergleichbaren, signifikanten Anstieg der Migrationsrate. Der Ausgangswert der Zellen, welche lediglich Basalmedium erhielten, lag bei einem Wert von $44,2 \pm 10,1 \%$. Eine Behandlung mit Sildenafil (Abbildung 4-11 B), oder mit 8-Br-cGMP (Abbildung 4-11 E) allein zeigte mit einer Migrationsrate von $108,4 \pm 17,5 \%$ (10 μ M Sildenafil) bzw. $98,2 \pm 17,3 \%$ (10 μ M 8-Br-cGMP) keine Veränderung der Zellmotilität. Lediglich die Inkubation mit 200 ng/ml 8-pCPT-cGMP (Abbildung 4-11 H) führte zu einer signifikanten Reduktion auf $56,9 \pm 11,8 \%$. Durch Inkubation mit Imatinib konnte die Migrationsrate bei einer Konzentration von 5 μ M Imatinib auf $43,7 \pm 4,7 \%$ reduziert werden, was einen vergleichbaren Wert der Ergebnisse unter PDGF-Stimulation darstellt.

Die Kombinationsbehandlungen zeigten anders als den mit PDGF-Stimulation durchgeführten Ansätzen keine signifikante Veränderung der Migrationsraten. Zwar lässt sich bei den Zellen, die mit 10 μ M Sildenafil und 0,5 μ M Imatinib ($67,6 \pm 7,9 \%$), als auch bei denen, die mit 10 μ M 8-Br-cGMP und 0,5 μ M Imatinib ($70,9 \pm 17,9 \%$) behandelt wurden, eine Tendenz erahnen, doch weichen diese Werte nicht signifikant von denen mit PDGF- plus BMP4-Stimulation oder denen mit 0,5 μ M Imatinib-Behandlung ab. Die Kombination von 200 ng/ml 8-pCPT-cGMP und 0,5 μ M Imatinib führte sogar zu einer höheren Zellmigrationsrate ($72,3 \pm 10,5 \%$) als eine adäquate Konzentration von 8-pCPT-cGMP allein.

Eine Einzelstimulation mit 30 ng/ml BMP4 (Abbildung 4-11 C, F, I) zeigte im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen keine Veränderung der Migrationsrate (Ausgangswert $84,5 \pm 17,1 \%$). Die Einzelbehandlung mit Imatinib beeinflusste die Migrationsrate der Zellen ebenso wenig wie eine Behandlung mit Sildenafil (Abbildung 4-11 C), 8-Br-cGMP (Abbildung 4-11 F) oder 8-pCPT-cGMP (Abbildung 4-11 I). Auch die Kombination von Imatinib mit Sildenafil bzw. den cGMP-Analoga zeigte keinen eindeutigen Effekt auf die Migrationsrate der HPASMCs unter BMP4-Stimulation.

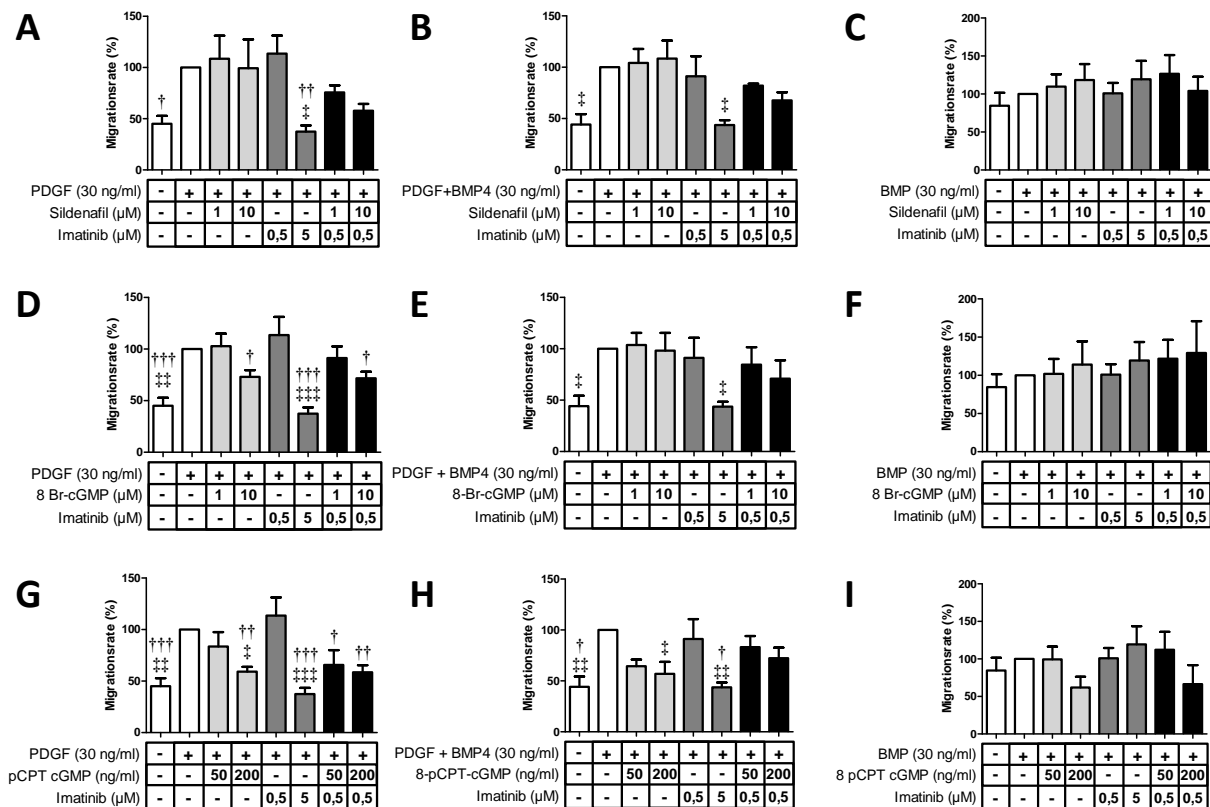


Abbildung 4-11: Auswirkungen der Kombination von Sildenafil, sowie PKG Aktivatoren und Imatinib unter PDGF- und/oder BMP4 Stimulation auf die Zellmotilität von HPASMCs. Nach 24 h Inkubation unter Basalmilieu erfolgte eine Stimulation mit 30 ng/ml PDGF (A, D, G), 30 ng/ml BMP4 (C, F, I) oder einer Kombination beider Liganden (B, E, H). Behandelt wurden die Zellen mit 1 µM bzw. 10 µM Sildenafil (A, B, C), 1 µM bzw. 10 µM 8-Br-cGMP (D, E, F), 50 ng/ml bzw. 200 ng/ml 8-pCPT-cGMP (G, H, I) und/oder 0,5 µM bzw. 5 µM Imatinib. Die Messdauer betrug 7 std, wobei die Werte PDGF- bzw. BMP4-stimulierter Proben als 100% definiert wurden. Alle Ergebnisse wurden als Mean ± SEM angegeben (n=5 {C, F, I}, n=6 {A, B, D, E, G, H}). †P < 0,05 vs. 0,5µM Imatinib, *P < 0,05 vs. PDGF.

4.3 Physiologische Auswirkungen der Kombination von Sildenafil und Imatinib im MCT-Rattenmodell

Schließlich sollte die Auswirkung der Kombination von Sildenafil und Imatinib auf den gesamten Organismus ermittelt werden. Für eine Untersuchung im lebenden Säugetier wurde das Monocrotalin-Rattenmodell verwendet. In diesem Abschnitt sollte auf den Effekt einer Kombination von Sildenafil und Imatinib auf das Rattenherz selbst, sowie auf die Hämodynamik der Ratte eingegangen werden. Diese Untersuchungen wurden in der Arbeitsgruppe Schermuly unter Aktenzeichen GI 20/10 Nr.68/2007 ff. von Frau Sandra Scheidl durchgeführt.

4.3.1 Der Einfluss einer Kombinationstherapie auf den rechtsventrikulären, arteriellen Druck, den Gefäßwiderstandsindex und die Rechtsherzhypertrophie in der Ratte

Jungen Sprague-Dawley Ratten wurde eine subkutane Injektion des Alkaloids Monocrotalin (MCT) verabreicht, wodurch diese eine akute pulmonale Hypertonie entwickelten. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten stattdessen eine Injektion mit isotonischer Kochsalzlösung. Die Individuen, welche eine MCT Injektion erhielten, wurden nach dem Zufallsprinzip in vier Versuchsgruppen separiert, die ab Tag 21 bis Tag 35 unterschiedlich behandelt wurden. Die erste Gruppe erhielt lediglich ein Placebo. Die Tiere der nächsten Gruppe erhielten 50 mg/kg/d des PDE5- Inhibitors Sildenafil, eine weitere Gruppe wurde mit 50 mg/kg/d des PDGF-Rezeptorblockers Imatinib behandelt. Der letzten Gruppe wurde eine Kombination aus 50 mg/kg/d Sildenafil und einer adäquaten Menge Imatinib verabreicht. Die Gabe der Medikamente bzw. des Placebos erfolgte Oral über das Trinkwasser der Tiere.

Am Tag 35 erfolgte die Auswertung der Daten. Eine Analyse des rechtsventrikulären systolischen Drucks (Abbildung 4-12 A) zeigte bei gesunden Tieren einen Wert von $30 \pm 0,9$ mmHg, welcher bei den Tieren, die durch MCT eine pulmonale Hypertonie entwickelt hatten, auf $83,6 \pm 7,9$ mmHg signifikant angestiegen war. Während eine Behandlung mit 50 mg/kg/d Imatinib mit $65,7 \pm 3,4$ mmHg zu keiner signifikanten Senkung dieses erhöhten Drucks führte, konnte mit derselben Menge Sildenafil eine signifikante Reduktion auf $49,8 \pm 3,3$ mmHg erreicht werden. Eine Kombination beider Medikamente zeigte mit $39,9 \pm 3,3$ mmHg nicht nur eine signifikante Senkung des rechtsventrikulären systolischen Drucks in Relation zu den Werten der Tiere, die eine MCT-Injektion erhielten, sondern ebenso zu denen, die eine Behandlung mit 50 mg/kg/d Imatinib erhalten hatten.

Anschließend erfolgte ein Vergleich der relativen Masse des rechten Ventrikels der behandelten Tiere, wofür als Messwert die Masse des rechten Ventrikels durch die gemeinsame Masse von linkem Ventrikel plus Septum dividiert wurde (Abbildung 4-12 B). Das Verhältnis des rechten Ventrikels betrug bei Tieren der Kontrollgruppe $0,26 \pm 0,007$. Durch die sich in der MCT-Gruppe entwickelnde pulmonale Hypertonie konnte eine signifikante Vergrößerung dieses Masse-Anteils auf $0,69 \pm 0,056$ detektiert werden. Die Behandlung mit Imatinib allein zeigte keine signifikante Verbesserung ($0,60 \pm 0,078$), jedoch konnte die Schwere dieser Rechtsherzhypertrophie durch die alleinige Zugabe von 50 mg/kg/d Sildenafil signifikant auf ein Verhältnis von $0,49 \pm 0,038$ gesenkt werden. Eine Kombinationstherapie mit 50 mg/kg/d Sildenafil und 50 mg/kg/d Imatinib zeigte mit einem Wert von $0,36 \pm 0,025$ nicht nur eine signifikante Senkung des Verhältnisses in Relation zu den MCT-behandelten Tieren, sondern auch eine signifikante Verringerung in Relation zu den Tieren, welche nach der MCT Injektion mit 50 mg/kg/d Imatinib behandelt wurden.

Die Injektion mit MCT und daraus resultierende Entwicklung einer PAH führte zu einem in Relation zur Kontrollgruppe signifikant erhöhten pulmonalvaskulären Widerstandsindex (pulmonary vascular resistance index, PVRI) (Abbildung 4-12 C). Dieser Wert betrug mit $2,8 \pm 0,24$ etwa das 2,5-Fache gesunder Tiere. Errechnet wurde der PVRI als Zeit in min dividiert durch das Blutvolumen in ml je 100 g Körpermasse. Weder eine Einzelbehandlung mit 50 mg/kg/d Sildenafil ($2,0 \pm 0,33$), noch mit 50 mg/kg/d Imatinib ($2,5 \pm 0,27$) sorgten für eine signifikante Veränderung. Allerdings konnte durch die kombinierte Behandlung beider Medikamente eine signifikante Reduktion des PVRI auf $1,2 \pm 0,11$ in Relation zu den Werten der MCT-Gruppe, als auch in Relation zu der 50 mg/kg/d Imatinib-behandelten Gruppe hergestellt werden, so daß nahezu den Wert der Kontrollgruppe von $1,1 \pm 0,12$ erreicht wurde.

Der Vergleich des systemisch-vaskulären Widerstandsindex der einzelnen Gruppen lies keine signifikante Änderung als Folge der MCT Injektion und daraus resultierender PAH erkennen (Abbildung 4-12 D). Auch zeigte dieser Wert weder nach Einzelbehandlung mit 50 mg/kg/d Sildenafil bzw. 50 mg/kg/d Imatinib, noch nach Kombinationsbehandlung mit beiden Substanzen eine signifikante Änderung. Die Werte der einzelnen Versuchsansätze schwankten zwischen $3,8 \pm 0,63$ (Kontrollgruppe) und $2,8 \pm 0,21$ (Kombinationsgruppe Sildenafil und Imatinib).

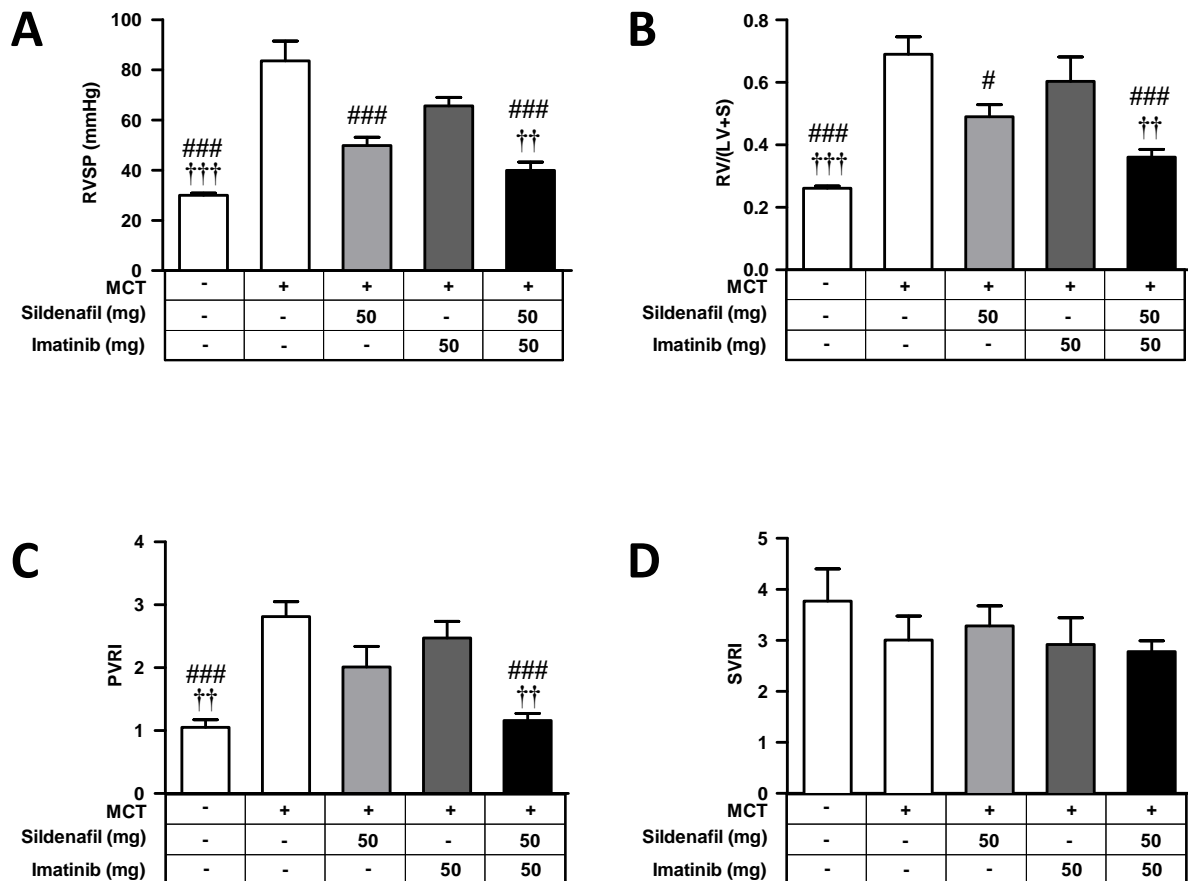


Abbildung 4-12: Effekt von Imatinib und/oder Sildenafil auf den rechtsventrikulären systolischen Druck (right ventricular systolic pressure, RVSP, mmHg) (A), Massenverhältnis der rechten Herzhälfte zu linker Herzhälfte plus Septum (right heart hypertrophy, RV/{LV+S}) (B), pulmonalvaskulärer Widerstandsindex (pulmonary vascular resistance index, PVRI, mmHg*min/(ml*100 g Körpermasse)) (C) und systemischer, vaskulärer Widerstandsindex (systemic vascular resistance index, SVRI mmHg*min/ml*100 g Körpermasse)) (D). Sildenafil (50 mg/kg/d) und Imatinib (50 mg/kg/d) wurden oral von Tag 21 bis Tag 35 verabreicht. Alle Werte wurden als Mittelwert \pm SEM angegeben (n=12). $^{\dagger}P < 0,05$ vs. 0,5 μ M Imatinib, $^{\#}P < 0,05$ vs. MCT.

4.3.2 Molekulare Auswirkungen einer Sildenafil-Imatinib-Kombinationstherapie auf das Rattenherz

Anschließend wurde die molekularen Auswirkungen der Kombinationstherapie auf das Rattenherz untersucht. Die Behandlung der Tiere entsprach der Durchführung in Abschnitt 4.3.1.

Am Tag 35 nach MCT-Injektion wurde den Tieren die Herzen entnommen und mittels der Trizol/Chloroform-Methode RNA daraus isoliert. Mittels reverse-Transkriptase RT-PCR wurden die erhaltenen RNA Proben auf die mRNA der Myosin Heavy chain 6 und 7, Cyclin D1 und des A-Typ und B-Typ Natriuretischen Peptids untersucht. Dargestellt wurden diese Ergebnisse als $\Delta\Delta Ct \pm SEM$.

In den Gewebeproben der MCT/Placebo-Tiere konnte eine um $-2,66 \pm 0,53$ verringerte Konzentration an schwere Kette 6 Myosin mRNA in Relation zu den Proben der Negativkontrollen gemessen werden (Abbildung 4-13 A). Eine Behandlung mit 50 mg/kg/d Sildenafil oder 50 mg/kg/d Imatinib führte jeweils zu einer signifikanten Steigerung des mRNA-Levels in Relation zu dem der MCT-Tiere (Sildenafil $-1,17 \pm 0,42$, Imatinib $-1,31 \pm 0,16$). Die Kombinationsbehandlung mit 50 mg/kg/d Sildenafil und einer adäquaten Menge Imatinib zeigte hingegen nur eine schwächere, nicht signifikante Steigerung des schwere Kette 6 Myosin-mRNA-Levels auf $-1,74 \pm 0,23$.

Die Analyse der mRNA-Konzentration für die schwere Kette 7 des Myosins zeigte in der Gruppe, welche nach der MCT Injektion lediglich ein Placebo erhalten hatte, eine in Relation zur Negativkontrolle erhöhte Konzentration von $4,02 \pm 0,23$ an Myosin mRNA (Abbildung 4-13 B). In Relation zu dieser Versuchsgruppe zeigten alle anderen Tiere signifikant verringerte mRNA-Konzentrationen, wobei sich die relativen Mengen zwischen den Proben, die mit 50 mg/kg/d Imatinib ($2,59 \pm 0,28$) und den Proben, die mit einer Kombination von jeweils 50 mg/kg/d Sildenafil und Imatinib behandelt wurden, praktisch nicht unterschieden ($2,57 \pm 0,21$). Lediglich die Gruppe, die mit 50 mg/kg/d Sildenafil behandelt wurde, ließ eine signifikant verringerte mRNA-Konzentration ($1,17 \pm 0,16$) im Vergleich zu den mit 50 mg/kg/d Imatinib behandelten Proben feststellen.

Die Untersuchung der mRNA des Zellzyklusmarkers Cyclin D1 zeigte in den Proben der MCT/Placebo-Tiere im Verhältnis zu Kontrollgruppe eine erhöhte mRNA Konzentration ($1,83 \pm 0,22$, Abbildung 4-13 C). Die Behandlung mit 50 mg/kg/d Sildenafil ($1,42 \pm 0,12$), als auch mit 50 mg/kg/d Imatinib ($1,41 \pm 0,18$) zeigte keine signifikante Veränderung des Cyclin D1 mRNA-Levels. Die Kombinationsbehandlung mit jeweils 50 mg/kg/d Sildenafil und Imatinib führte jedoch nicht nur zu einer signifikanten Senkung der Cyclin D1 mRNA Konzentration auf $0,11 \pm 0,04$ in Relation zur Placebogruppe, sondern auch in Relation zu den Proben, welche mit 50 mg/kg/d Imatinib allein behandelt wurden.

Durch die Injektion mit MCT und der daraus resultierenden Entwicklung einer PH war eine deutlich Erhöhte Konzentration der mRNA für das atriale natriuretische Peptid (ANP) mit einem $\Delta\Delta\text{CT}$ -Wert von $10,39 \pm 0,41$ in Relation zu den Proben der Negativkontrollen zu verzeichnen (Abbildung 4-13 D). Eine Behandlung mit 50 mg/kg/d Sildenafil ($7,23 \pm 0,57$) oder 50 mg/kg/d Imatinib ($6,17 \pm 0,39$), sowie einer Kombination beider Medikamente ($7,79 \pm 0,64$) zeigte eine signifikante Verringerung des ANP mRNA-Levels.

Eine Analyse der B-natriuretische Peptid (BNP) mRNA-Konzentrationen der Kontrollgruppe im Vergleich mit den der Werten der MCT-Gruppe, zeigte durch die Entwicklung einer PH eine deutliche Erhöhung des BNP mRNA-Levels auf $7,40 \pm 0,36$ (Abbildung 4-13 E). Eine Behandlung mit 50 mg/kg/d

Sildenafil konnte eine signifikante Senkung auf $5,48 \pm 0,61$ bewirken. Die Gruppe, welche mit 50 mg/kg/d ($4,72 \pm 0,36$) behandelt wurde, zeigte ebenfalls einen signifikanten Rückgang der BNP mRNA-Konzentration. Die Proben, welche aus den Tieren mit einer Kombinationstherapie von jeweils 50 mg/kg/d Sildenafil und Imatinib isoliert wurden, zeigten mit einem Wert von $3,57 \pm 0,23$ ebenfalls eine signifikante Verringerung der BNP mRNA-Konzentration in Relation zu den Proben der MCT-behandelten Tiere. Obwohl dieser Wert keine signifikante Abweichung in Relation zur Einzelbehandlung mit 50 mg/kg/d Imatinib erreicht, ist eine Tendenz eines durch die Kombination von Sildenafil und Imatinib verstärkten Effekts zu erahnen.

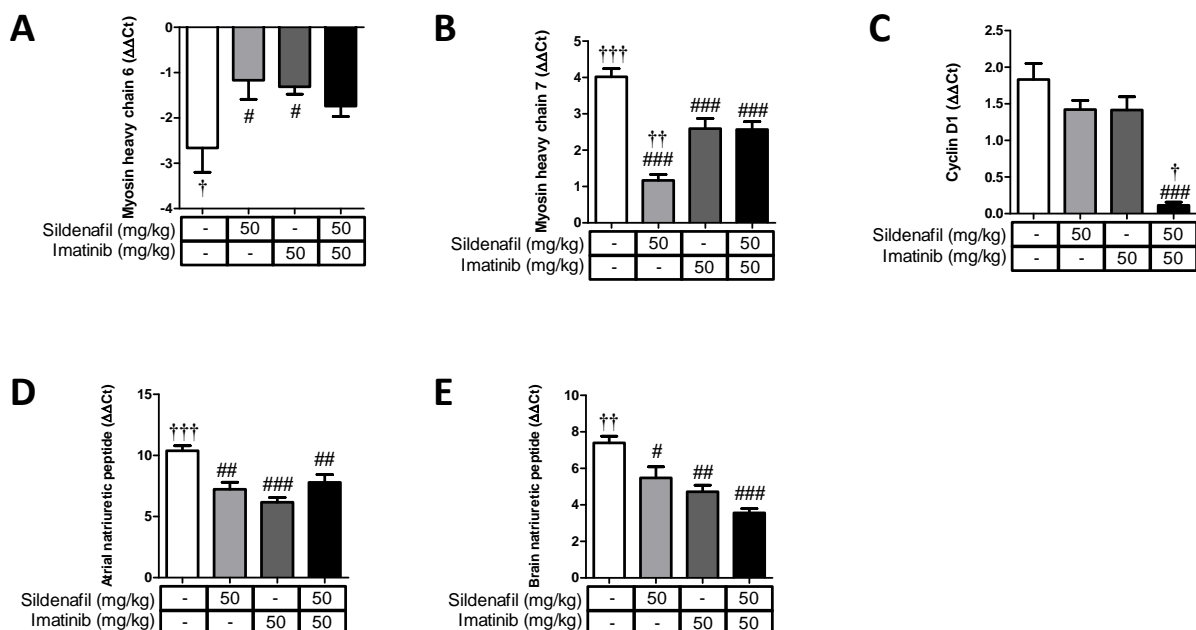


Abbildung 4-13: Effekt der Kombination von Sildenafil und Imatinib auf die RNA-Expression im rechten Ventrikel des Rattenherzens. Sildenafil (50 mg/kg/d) und/oder Imatinib (50 mg/kg/d) wurden oral von Tag 21 bis Tag 35 verabreicht. Mit den aus rechtsventrikulären Homogenaten isolierten RNA-Proben wurde anschließend eine RT Real-Time PCR durchgeführt, um die relative Menge an Myosin heavy chain 6 mRNA (A) und Myosin Heavy Chain 7 mRNA (B), der mRNA des Zellzyklusmarkers Cyclin D1 (C) und der mRNA des atrialen (D) und des B-Typ Natriuretischen Peptids (E) zu untersuchen.). [#]P < 0,05 vs. MCT, [†]P < 0,05 vs. 50 mg/kg/d Imatinib (n=4).

4.3.3 Einfluß der Behandlung von Sildenafil auf den BMP-Signalweg in der Rattenlunge

Das Krankheitsbild der pulmonalen Hypertonie manifestiert sich in den kleineren Gefäßen der Lunge. Aus diesem Grund sollte eruiert werden, in wieweit sich die Entwicklung einer PAH durch MCT, sowie eine Behandlung dieser mittels Sildenafil und/oder Imatinib im lebenden Organismus auf den SMAD-Signalweg in den SMCs eben dieser Gefäße auswirkt.

Für diese Untersuchungen wurden junge Sprague-Dawley Ratten wie in Abschnitt 4.3.1 beschrieben behandelt. Am Tag 35 wurde den Tieren der rechte Lungenflügel entnommen, in Formaldehyd fixiert und mittels Paraffin entwässert und eingeblockt. Anschließend konnten die angefertigten Schnitte mit entsprechenden Antikörpern gefärbt und unter dem Mikroskop analysiert werden.

Für die Analyse der Auswirkungen auf den SMAD-Signalweg wurden zwei Schlüsselpositionen untersucht. Zum einen wurde die Expression des relevanten Rezeptors BMPR2 von kranken und gesunden Tieren mit der von Sildenafil- und/oder Imatinib-behandelten Individuen verglichen. Zum anderen wurde durch Analyse des p-SMAD1/5/8-Komplexes aufgezeigt, wie aktiv der SMAD-Signalweg während einer MCT-induzierten PAH in Relation zu gesunden oder behandelten Individuen ist.

Die untersuchten Schnitte gesunder Tiere zeigten eine gleichmäßige, deutlich erkennbare, scharfe BMPR2-Expressionslinie in den Zellen nahe des Gefäßlumens, die mehrere Zellschichten umfasste (Abbildung 4-14 A, rote Färbung). Die Proben der Tiere, welche durch eine MCT-Injektion eine PAH entwickelten, wiesen im Vergleich hierzu eine stark verdickte Gefäßwand und eine deutlich schwächere Expression des Rezeptorproteins auf (Abbildung 4-14 B). Zudem war in diesen Proben erkennbar, daß sich die BMPR2-Expression im Vergleich zu gesunden Tieren nicht über einen Großteil der Gefäßwand erstreckt. Sie ist nur im inneren Bereich, also dem Endothel zu verzeichnen. Weiterhin wird in den meisten SMCs kein oder nur sehr wenig BMPR2 gebildet. Eine Behandlung mit 50 mg/(kg*d) Sildenafil zeigte eine deutliche Reduktion der Gefäßwanddicke der kleinen Blutgefäße in Relation zu den Proben, welche nach der MCT Injektion keine weitere Behandlung erhalten hatten. Ebenso konnte eine höhere BMPR2-Expression in den Sildenafil-behandelten Tieren nachgewiesen werden. Diese erstreckte sich nahezu auf die Gesamtheit der Gefäßwände. Ähnliche Ergebnisse zeigten die Proben, die mit 50 mg/(kg*d) Imatinib behandelt wurden (Abbildung 4-14 D). Auch die Proben dieser Tiere zeigten in Relation zu den MCT-behandelten Tieren eine deutlich höhere BMPR2-Expression über nahezu den gesamten Gefäßwanddurchmesser und eine merklich verringerte Gefäßwandverdickung. Die Kombinationsbehandlung mit 50 mg/(kg*d) Sildenafil und 50 mg/(kg*d) Imatinib ließ eine BMPR2-Expressionsrate erkennen, die die Expression der Einzelbehandlungen als auch die der gesunden Kontrolltiere übertraf (Abbildung 4-14 E). Ebenso zeigte sich, daß die Gefäßwände der kombinationsbehandelten Tiere tendenziell weniger muskularisiert waren als die der Tiere, die lediglich mit einem der Medikamente behandelt wurden.

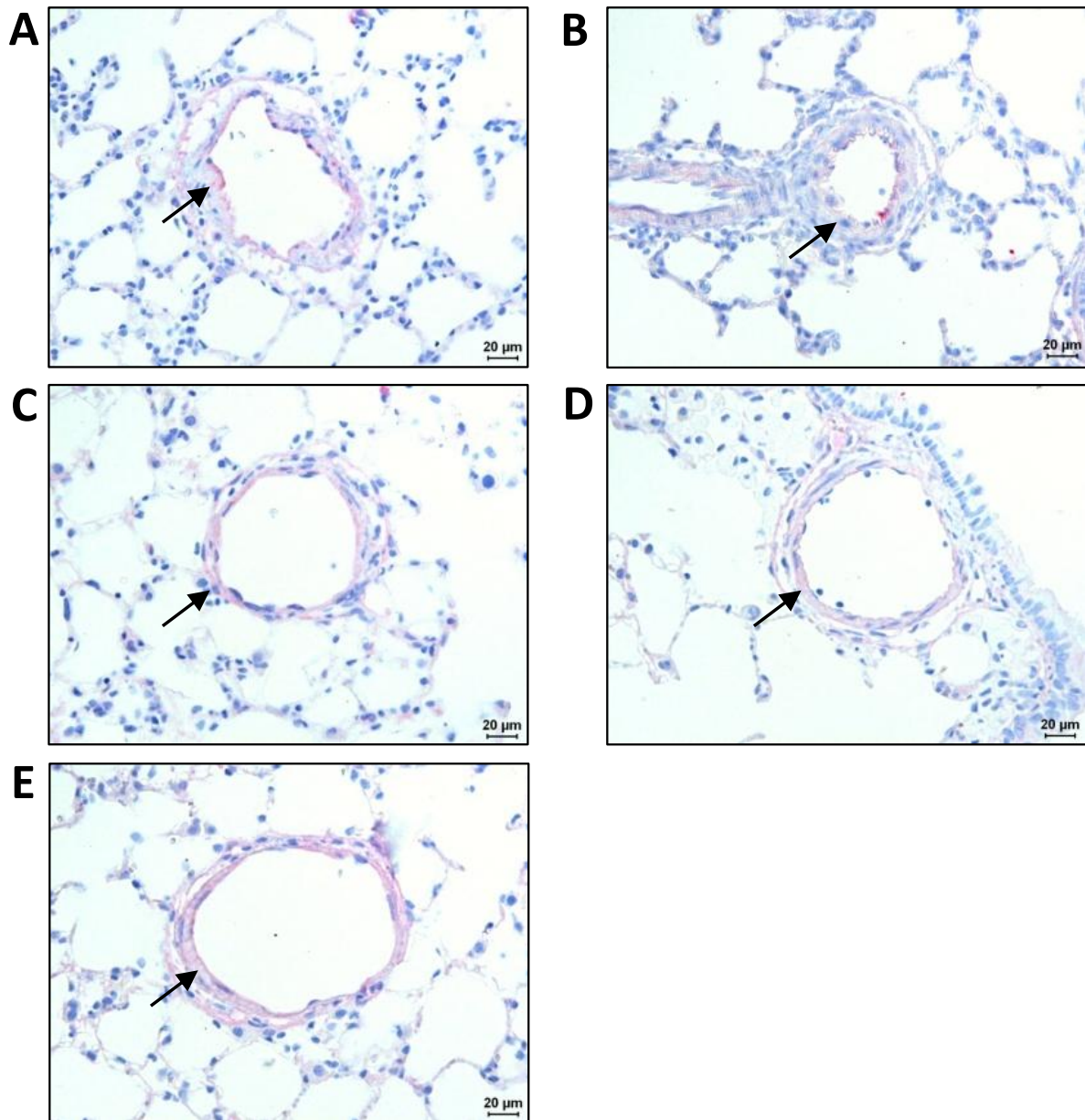


Abbildung 4-14: Histologische Untersuchung der BMPR2-Expression kleinerer Blutgefäße in der Rattenlunge. Sildenafil (50 mg/kg/d) und Imatinib (50 mg/kg/d) wurden oral von Tag 21 bis Tag 35 nach MCT-Injektion verabreicht. Verglichen wurden gesunde Tiere (A) mit Individuen, die durch MCT-Injektion eine PAH entwickelten (B), sowie Tieren, die mit Sildenafil (C), Imatinib (D) oder einer Kombination aus beiden Medikamenten (E) behandelt wurden. (n=4)

Die anschließende Auswertung der p-SMAD1/5/8-gefärbten Schnitte zeigte bei gesunden Tieren eine deutliche Expression in den Gefäßwänden (Abbildung 4-15 A, rote Färbung). Die Proben der Tiere, welche eine MCT-Injektion erhalten hatten, wiesen neben der Verdickung der Gefäßwand auch einen deutlichen Rückgang der p-SMAD1/5/8-Konzentration auf. Diese besaß ihren Konzentrationsschwerpunkt im Endothel, während der Großteil der stark verdickten Gefäßwand keine erkennbare Menge an p-SMAD1/5/8 aufwies (Abbildung 4-15 B).

Die Behandlung mit Sildenafil (Abbildung 4-15 C) zeigte eine leichte Steigerung des p-SMAD1/5/8-Levels. Merklich stärker fiel dieser Effekt jedoch mit einer Behandlung durch Imatinib aus (Abbildung 4-15 D). Die Kombinationsbehandlung mit Sildenafil und Imatinib steigerte die Konzentration von p-SMAD1/5/8 hingegen auf ein Level, welches mit dem gesunder Proben vergleichbar war und zudem mehrere Zellschichten der Gefäßwand umfasste.

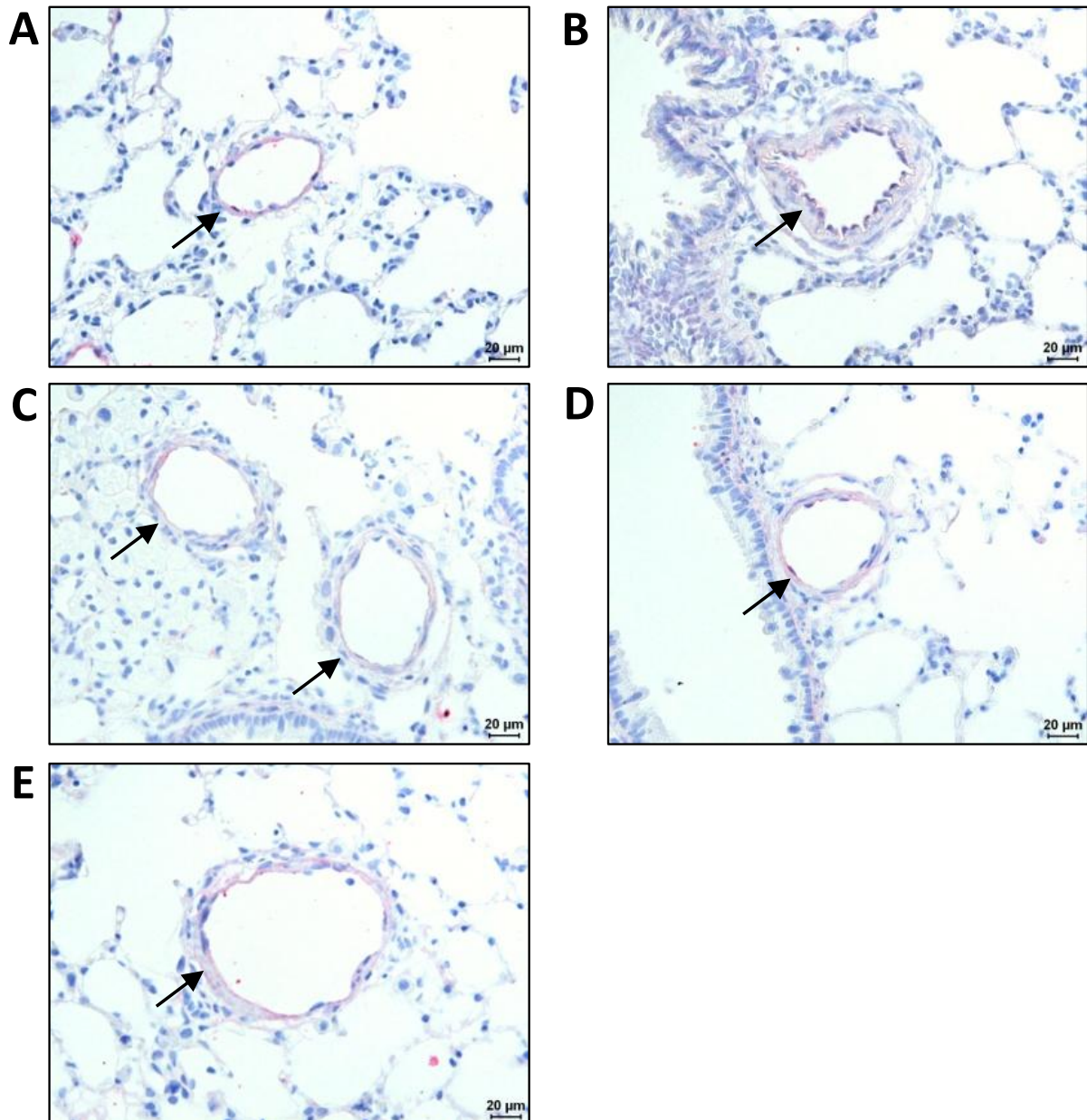


Abbildung 4-15: Histologische Untersuchung der p-SMAD1/5/8-Expression kleinerer Blutgefäße in der Rattenlunge. Sildenafil (50 mg/kg/d) und Imatinib (50 mg/kg/d) wurden oral von Tag 21 bis Tag 35 nach MCT-Injektion verabreicht. Verglichen wurden gesunde Tiere (A) mit Individuen, die durch MCT-Injektion eine PAH entwickelten (B), sowie Tiere, die mit Sildenafil (C), Imatinib (D) oder einer Kombination aus beiden Medikamenten (E) behandelt wurden. (n=4)

5. Diskussion

Die pulmonalarterielle Hypertonie ist eine multifaktorielle, progressive Krankheit mit erheblicher Morbiditäts- und Mortalitätsrate, deren stoffwechselphysiologische Vorgänge bis heute nicht vollständig geklärt sind. Hauptursache ist eine fortschreitende Erhöhung des pulmonalen Gefäßwiderstands, der durch Reorganisation der *Adventitia*, *Media* und *Intima* der distalen Lungenarterien verursacht wird (155). Ursache sind erhöhte Proliferation und Apoptose-Resistenz pulmonaler SMCs (11). Betroffen sind durchschnittlich 20 bis 50 Personen pro Million Einwohner (156), (157), mit einer durchschnittlichen Lebenserwartung von 2,8 Jahren ab Diagnose (158), (159). In den letzten eineinhalb Jahrzehnten ist es gelungen, mit der Einführung von Prostazyklin-Analoga, Endothelinrezeptor-Antagonisten und PDE5-Inhibitoren, welche direkten Einfluss auf endotheliale und vasokonstriktive Dysfunktion nehmen, den Fortschritt dieser Krankheit zu verlangsamen (153), (160), (161). Jedoch ist es bis dato nicht möglich, PAH Patienten vollständig zu heilen. Stattdessen zielen die meisten Behandlungsmethoden darauf ab, mittels Vasodilatation, verbesserter Sauerstoffversorgung und daraus resultierender Förderung der körperlichen Leistungsfähigkeit die Lebensqualität zu verbessern (162). In den letzten Jahren konnten viele neue Ansatzpunkte für die Behandlung von PH aufgedeckt werden, so u.a. die Modulation von Guanylatzyklasen, PDEs, Tyrosinkinasen, BMP-Signaling oder Ionenkanälen. Zudem besteht die Hoffnung, daß durch Optimierung und Kombination dieser Behandlungen, insbesondere von gefäßerweiternden und antiproliferativen Eigenschaften eine weitere, möglicherweise synergistische Wirkungssteigerung erreicht werden kann. (153)

In den nachfolgenden Abschnitten wurde die Behandlung mit Sildenafil und/oder Imatinib einer direkten Stimulation durch BMP4 gegenübergestellt. Diese Versuchsanordnung ermöglichte es, den indirekten Effekt der Therapie durch die oben genannten Wirkstoffe mit dem direkten Effekt BMP4-induzierter Aktivierung des SMAD-Signalwegs zu vergleichen.

5.1. Sildenafil

Die Produktion von endotheliale Stickstoffmonoxid (NO) und die Stimulation der in glatten Muskelzellen enthaltenen löslichen Guanylatzyklase (sGC) um zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) zu generieren, ist ein wichtiger antiproliferativer Signalweg in pulmonalen Gefäßzellen (163). Die Phosphodiesterase 5 (PDE5) ist größtenteils verantwortlich für die Hydrolyse von cGMP und wird im pulmonalen Kreislauf deutlich stärker exprimiert als in systemischen Gefäßen (32). Zudem produzieren Epithelzellen (ECs) von Patienten mit idiopathischer pulmonalarterieller Hypertonie (IPAH) geringere Mengen NO, als die gesunder Menschen (164). Verringerte endotheliale

NO-Produktion, sowie erhöhte PDE5 Expression und Aktivität sind zwei wichtige pathologische Faktoren der PAH. Das Ergebnis dieser beiden Faktoren ist eine verringerte intrazelluläre cGMP-Konzentration, die wiederum zu Vasokonstriktion und Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen führt. Der PDE5-Inhibitor Sildenafil ist zur Behandlung der pulmonalen Hypertonie seit 2006 in Deutschland zugelassen (165).

5.1.1. Sildenafil hemmt die Zellteilungsrate pulmonal-arterieller glatter Muskelzellen durch Stimulation der PKG

Die Proliferation von Zellen gehört neben Adhäsion und Migration zu den wichtigsten Vorgängen, welche das Krankheitsbild der PAH maßgeblich beeinflussen (166). Durch die erhöhte Zellteilungsrate von glatten Muskelzellen (SMCs) wird der Durchmesser pulmonaler Arterien verringert, was schließlich zur Rechtsherzhypertrophie führt (167). Eine Analyse der Zellproliferationsraten schien daher als der erste logische Schritt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß eine Behandlung mit Sildenafil die Proliferationsrate von HPASMCs nach Stimulation mit fötalem Kälberserum (FCS) oder dem „platelet derived Growth Factor“ (PDGF) signifikant verringert (Abbildung 4-1). Weiterführende Untersuchungen belegten, daß die antiproliferative Wirkung des Sildenafils durch die Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase 1 (cGKI oder PKG) zu Stande kommt, da eine direkte Stimulation dieser zu einem entsprechenden Ergebnis der Sildenafilstimulation führt. PKG ist eine Serin/Threonin-spezifische Kinase, welche durch cGMP aktiviert wird. Sie ist unter anderem beteiligt an der Regulation verschiedener biologisch wichtiger Ziele, wie der Relaxation glatter Muskelzellen, Zellteilung und Nukleinsäuresynthese (168). Für diesen Nachweis wurden in einer entsprechenden Versuchsanordnung HPASMCs mit den PKG-Agonisten 8-Br-cGMP und 8-pCPT-cGMP anstelle des Sildenafils behandelt (Abbildung 4-2 und Abbildung 4-3), um PKG direkt und nicht über den Umweg des Sildenafils zu aktivieren. 8-Br-cGMP ist ein hochwirksamer Aktivator für die Proteinkinase I α , wobei es die relative Aktivierungskonstante seines Derivats cGMP um das 4,3-fache übertrifft (169). Desweiteren ist es in der Lage, in geringerem Maße die Proteinkinase I β (170), sowie die Proteinkinase II (171) und cGMP-vermittelte Ionenkanäle (172) zu aktivieren. Obwohl es hoch permeabel ist und seine metabolische Stabilität weit höher liegt, als die des natürlich vorkommenden cGMP, ist 8-Br-cGMP nicht absolut stoffwechselresistent (173). Im Vergleich deutlich stabiler ist der PKG Agonist 8-pCPT-cGMP, welcher neben den cGMP vermittelten Ionenkanälen nur die cGMP-abhängigen Proteinkinasen I α und II abdeckt (174).

5.1.2. Sildenafil beeinflusst den Zellzyklus durch Regulation von Cyclin D1 und p21

Cycline spielen eine wichtige Rolle im Zellzyklus. Sie besitzen die Fähigkeit, mit Cyclin-abhängigen Kinasen Komplexe einzugehen und so deren Kinasefunktion zu aktivieren. Um die Cyclin-abhängigen Kinasen im Zellzyklus zu steuern, sind Cycline nicht gleichmäßig, sondern - je nach Phase der Zelle - in schwankender Konzentration anzutreffen. So steigt beispielsweise die Konzentration an Cyclin D1 in der G₁ Phase an, um schließlich in der G₂-Phase und während der Mitose wieder abzunehmen (175). Dabei ist Cyclin ein wichtiger Regulator der Zellproliferation (176) für den Fortschritt des Zellzyklus von der G₁- in die S-Phase, ist aber auch in vielen Krebsarten übermäßig vorhanden (177), (178) und kann durch Stimulation mit PDGF verstärkt exprimiert werden (178), (179). Ebenso zeigten Pan *et al.* daß eine Hemmung des Nor1/Cyclin D1 Signalwegs ebenso eine Hemmung von Proliferation und Migration zur Folge hat (179), (180).

Die Reduktion der Cyclin D1 Konzentration, die durch die 24-stündige Inkubation von HPASMCs mit Sildenafil (Abbildung 4-4 B) und anschließender Quantifizierung mittels Western Blot aufgezeigt werden konnte, zeigt, daß der antiproliferative Einfluß, der von Sildenafil schon seit längerem bekannt ist (181), u. a. mittels Konzentrationsänderung des Cyclin D1 ausgeübt wird.

Der Cyclin-abhängige Kinaseinhibitor p21 ist ein wichtiger Faktor in der Regulation des Zellzyklus und wird hauptsächlich auf transkriptioneller Ebene gesteuert. Während die Induktion von p21 für gewöhnlich zu einer Unterbrechung des Zellzyklus führt, kann eine Unterdrückung von p21, abhängig von diversen zellulären und viralen Faktoren, eine Vielzahl von Ergebnissen zur Folge haben. Obgleich p21 die Fähigkeit besitzt, die Proliferation zu hemmen und so als Tumorsuppressor zu fungieren, ist es gleichzeitig auch ein Inhibitor der Apoptose (182). Eine Reduktion von p21 kann also zum einen eine proliferationsfördernde Wirkung haben, jedoch gleichzeitig durch eine Reduktion der Lebenserwartung der Zellen zur Verbesserung des Krankheitsbildes beitragen. Durch Zuhilfenahme der Analyse der mit Cyclin D1 durchgeführten Versuche ist hier jedoch anzunehmen, daß eine Behandlung mit Sildenafil, wie in Abbildung 4-4 B zu erkennen, den Zellzyklus hemmt. Desweiteren kann geschlossen werden, daß die Behandlung mit Sildenafil neben der Inhibition des Zellzyklus auch die Apoptose von PSMCs begünstigt.

5.1.3. Die Wirkung von Sildenafil auf pulmonalarterielle Muskelzellen

Die Phosphorylierung, insbesondere von Proteinen gehört zu den wichtigsten Regulationen von biologischen Prozessen. Die Enzyme, welche Phosphorylgruppen von Adenosintriphosphat (ATP) auf Akzeptoren übertragen, werden als Kinasen bezeichnet. Dieser Vorgang kann mittels Phosphatasen umgekehrt werden. Die Phosphorylierung solcher Aminosäuren, wie Tyrosin, Serin oder Threonin hat eine Konformationsänderung des Moleküls auf Grund der negativen Eigenladung der Phosphatgruppe zur Folge. Diese beiden alternierenden Zustände stellen für gewöhnlich die aktive, sowie die inaktive Form des jeweiligen Moleküls dar. Verschiedene Signaltransduktionskaskaden aktivieren durch diesen Mechanismus schließlich nachgeschaltete Transkriptionsfaktoren, die wiederum Einfluß auf Zellteilung, Metabolismus oder Apoptose nehmen. (183), (184)

Der mitogen-activated protein (MAP-) Kinase-Weg ist ein mehrstufiger Signaltransduktionsweg. Durch einen äußeren Reiz werden mehrere in Reihe geschaltete Kinasen aktiviert, um so schließlich Transkriptionsfaktoren im Nukleus zu aktivieren. Ein Beispiel eines solchen MAP-Kinase Signalwegs ist die ERK1/ERK2-Kaskade (ERK = extracellular regulated Kinase), in der nacheinander Raf (Raf = "rapidly accelerated fibrosarcoma" oder „rat fibrosarcoma“, eine Proteinkinase), MEK1/2 (MEK = MAP2K, Mitogen-activated protein kinase kinase, diese werden durch Raf aktiviert und phosphorylieren die „Mitogen activated protein kinase“) und ERK1/ERK2 aktiviert werden, was schließlich Zellwachstum, Differenzierung und Zellproliferation zur Folge hat (185). Dieser Signalweg ist bei knapp einem Drittel aller Krebsarten dauerhaft aktiv (186). Die Analyse von Proteinphosphorylierungen erlaubt daher, die genauen Auswirkungen eines äußeren Faktors, wie eines Wachstumsfaktors oder Medikaments, auf die Zelle zu untersuchen, um den Wirkungsweg des Faktors nachzuverfolgen.

Die Western Blot Analyse machte deutlich, daß eine Einzelbehandlung von PSMCs für 30 min mit Sildenafil allein weder einen Einfluss auf dem SMAD-Signalweg (MAD = mothers against decapentaplegic gene, SMA = small body size protein) ausübt, noch auf den antagonistischen „transforming growth factor beta“ (TGF- β -) Signalweg. Ebenso konnte durch eine Sildenafil-Behandlung keine Veränderung der Phosphorylierung und damit der Aktivität von ERK, Proteinkinase B (AKT) oder der Glykogen Synthase Kinase 3 beta (GSK-3 β) an den Phosphorylierungsstellen Serin 9 (S9) oder Tyrosin 216 (Y216) verzeichnet werden. Auch konnte mittels Real Time RT-PCR nachgewiesen werden, daß eine Behandlung mit Sildenafil allein die mRNA Synthese der rezeptorassoziierten (R-) SMADS 1/5/8 oder SMAD3, der Rezeptoren ACVR2a, „bone morphogenetic protein receptor“ 1a (BMPR1a), BMPR1b und BMPR2, sowie die Zielgene „inhibitor of DNA binding protein“ 1 (ID1), ID2 und ID3 beeinflusst.

Ein Vergleich der Zellmigrationsraten lies erkennen, daß Sildenafil keinen signifikanten Einfluß auf die Zellmotilität ausübt. Auch eine Kombination von Sildenafil und BMP4 (Abbildung 4-11 A) wirkte sich

nicht auf die Beweglichkeit der Zellen aus (Abbildung 4-11 B). Vergleichende Versuche mit 8-Br-cGMP und 8-pCPT-cGMP ließen feststellen, daß einerseits auch hier keine Änderung der Zellmigration durch eine Kombination mit BMP4 zu erreichen ist, jedoch die Einzelstimulation der Proteinkinase G (PKG) durch 200 ng/ml 8-pCPT-cGMP eine Reduktion der Zellmigrationsrate zur Folge hat. Obwohl bisher wenig über den Zusammenhang zwischen Sildenafil und der Migration von PASMCs bekannt ist, gibt es bereits Hinweise, daß dies möglich sein könnte. So fanden Kawasaki *et al.* heraus, daß eine Behandlung mit 8-Bromo-cGMP die Migration von Endothelzellen beeinflusst (187).

5.1.4. Eine Behandlung mit Sildenafil wirkt sich positiv auf Kreislauf und rechten Ventrikel aus und verbessert den Zustand des pulmonalarteriellen Gefäßwandaufbaus

Zur Erfassung des Einflusses von Sildenafil auf die Auswirkungen im lebenden Organismus wurden MCT-behandelte Ratten von Tag 21 bis Tag 35 nach Monocrotalin (MCT) Injektion 50mg/(kg*d) Sildenafil verabreicht.

MCT ist ein Pyrrolizidinalkaloid aus *Crotalaria*, welche zur Familie der Leguminosae gehört. Pyrrolizidinalkaloide werden in der Leber verstoffwechselt, wodurch pyrrolische Dehydro-Alkaloide, in diesem Falle Dehydromonocrotalin oder Monocrotalin-Pyrrol, entstehen, die dann von den Leberzellen in die Blutbahn abgegeben werden. Auf diesem Weg gelangen diese reaktiven, alkylierenden Verbindungen in die Lunge, wo sie der Auslöser für Gefäßläsionen sind. Der Wirkstoff selbst wird innerhalb weniger Minuten verstoffwechselt und schließlich über die Nieren ausgeschieden, so daß er innerhalb eines Tages nicht mehr nachweisbar ist (15), (79), (80).

Hämodynamische Messungen zeigten hierbei, daß die Behandlung mit Sildenafil eine signifikante Senkung des rechtsventrikulären systolischen Drucks (Abbildung 4-12 A), und eine Verringerung der Rechtsherzhypertrophie (Abbildung 4-12 B) zur Folge hat, ohne jedoch den systemisch vaskulären Widerstandsindex (Abbildung 4-12 D) signifikant zu beeinflussen.

Diese Daten decken sich mit den Ergebnissen von Schermuly *et al.* (21), Jackson *et al.* (188) und Madhani *et al.* (189), welche ebenfalls eine Reduktion des systemischen und pulmonalarteriellen Drucks durch die Behandlung mit Sildenafil, bzw. die Erhöhung des cGMP-Levels durch sGC-Stimulation in Tierversuchen und klinischen Studien nachweisen konnten. Ebenso konnte in anderen Studien bestätigt werden, daß PDE5-Inhibitoren primär den pulmonalvaskulären Widerstand verringern, den systemischen Widerstand jedoch kaum beeinflussen und damit spezifisch auf pulmonale Gefäße wirken (190), (191). Auch zeigten klinische Studien bereits vergleichbare positive

Ergebnisse auf pulmonalarteriellen Druck, Herzindex, Belastbarkeit (192), sowie die Überlebensrate von PAH-Patienten (193).

Molekulare Untersuchungen aus Homogenaten solcher Sildenafil-behandelter Rattenherzen zeigten eine signifikante Steigerung in der Konzentration der schweren α -Kette Myosin-mRNA (Myh6) (Abbildung 4-13 A), sowie eine deutliche Reduktion der schweren β -Kette Myosin-mRNA (Myh7) (Abbildung 4-13 B). Die schwere Kette des Myosins ist essentieller Teil des muskulären Bewegungsapparats. Die Konzentration an mRNA, die für dieses Protein codiert, lässt daher Rückschlüsse zu, ob das Muskelgewebe, das gerade untersucht wird, sich im Muskelaufbau oder -abbau befindet. Bei PAH steigt durch Verringerung des Durchmessers der innere Widerstand der pulmonalen Gefäße, was bedeutet, daß ein erhöhter Druck notwendig ist, um weiterhin das gleiche Volumen Blut pro Zeiteinheit durch die Pulmonalarterien zu befördern. Indikatoren der dadurch eintretenden Rechtsherzhypertrophie sind eine vermehrte Synthese der RNA für die schwere β -Kette des Myosins (MYH7), sowie das atriale und b-Typ Natriuretische Peptid (194). Eine Herabregulierung der MYH6 mRNA mit gleichzeitiger Steigerung der MYH7 mRNA-Synthese sind allgemeine Antworten auf kardiale Verletzung (195), (196), (197). Hingegen konnte gezeigt werden, daß geringe Verschiebungen des Verhältnisses zu Gunsten MYH6, so wie sie hier beobachtet wurden, positiven Einfluss auf die kardiale Kontraktilität und Funktion in Nagetieren und dem Menschen zur Folge hat (198), (199), (200), (201).

Desweiteren zeigt eine Behandlung mit Sildenafil einen deutlichen Rückgang an atrialem natriuretischen Peptid (ANP) (Abbildung 4-13 D) und B-Typ natriuretischen Peptid (auch Brain Natriuretic Peptide, BNP) (Abbildung 4-13 E), ohne die Cyclin D1 mRNA (Abbildung 4-13 C) zu beeinflussen. BNP ist eines der beiden Natriuretischen Peptide, welche hauptsächlich in den Muskelzellen im Herzen exprimiert werden und eine wichtige Funktion in der Regulation des Wasserhaushalts und Blutdrucks ausüben (202). Während ANP bevorzugt in den Herzvorhöfen gebildet wird, wird BNP in den Herzkammern synthetisiert. Steigt der Blutdruck – beispielsweise durch ein vergrößertes Blutvolumen - an, oder staut sich das Blut zurück bis ins Herz, werden Dehnungsrezeptoren im rechten Vorhof bzw. in der Herzkammer aktiviert und das Herz schüttet ANP und BNP aus (203), (204). Die beiden Hormone bewirken zum einen eine erhöhte Ausscheidung von Natrium und Wasser durch die Nieren, wodurch das Blutvolumen reduziert wird, außerdem bewirkt die ANP- und BNP- Ausscheidung eine Gefäßerweiterung, die Blutdruck und Gefäßwiderstand senken soll (202).

Schermuly *et al.* zeigten bereits, daß durch eine Behandlung von jungen Sprague Dawley Ratten mit Monocrotalin und die anschließende Entwicklung einer PAH eine deutliche Zunahme der Gefäßmuskularisierung in normalerweise nicht muskularisierten, kleinen Pulmonalarterien

stattfindet, wobei bereits nach 28 Tagen die durchschnittliche Gefäßwanddicke um 28 % vergrößert war (60). Histologische Untersuchungen in dieser Arbeit konnten desweiteren aufzeigen, daß die kleinen pulmonalen Arterien der untersuchten Tiere nach einer Behandlung mit Sildenafil eine deutlich verringerte Muskularisierung im Vergleich zu den Tieren, die nach MCT Injektion lediglich ein Placebo erhielten, aufwiesen. Additionell zeigten die untersuchten Gewebe durch MCT-Behandlung eine reduzierte BMPR2- sowie p-SMAD1/5/8 Expression. Identische Veränderungen konnten bei einer 21-tägigen Studie bereits von Morrell *et al.* nachgewiesen werden (132). Im Vergleich hierzu wurde eine verstärkte Expression beider untersuchten Proteine durch die Behandlung mit Sildenafil nachgewiesen. Dies zeigt deutlich, daß die Reaktivierung des SMAD-Signalwegs bei PAH durch Sildenafil nicht nur auf Zellkulturversuche beschränkt ist, sondern sich auch auf den Organismus im MCT Rattenmodell übertragen läßt.

5.1.5. Zusammenfassung Sildenafil

Die Behandlung mit Sildenafil führte zu einer Reduktion der Zellteilungsrate pulmonalarterieller glatter Muskelzellen. Ein vergleichbares Ergebnis zeigte die direkte Stimulation der PKG mit cGMP-Analoga. Das läßt den Schluß zu, daß Sildenafil seine primäre Wirkung mittels indirekter Aktivierung dieser Kinase ausübt. Desweiteren verursachte Sildenafil auf Proteinebene eine Verringerung der Cyclin D1- und p21-Konzentration. Während die Verringerung der Cyclin D1-Konzentration eine Unterbrechung des Zellzyklus annehmen läßt, kann eine verringerte Konzentration an p21 neben anderen zellulären Antworten die Apoptose begünstigen.

Im MCT-Rattenmodell konnte durch eine Behandlung mit Sildenafil ein verringerter rechtsventrikulärer systolischer Druck und eine verringerte Rechtsherzhypertrophie beobachtet werden. Zudem zeigten die Herzen Sildenafil-behandelter MCT-Ratten erhöhte Konzentrationen an Myh6-mRNA und verringerte Myh7-mRNA-Konzentrationen. Ebenso wurden in den Herzen dieser Ratten verringerte Konzentrationen an ANP- und BNP-mRNA gemessen, was auf eine Verringerung des Organstressses schließen läßt. Zusätzlich zeigten histologische Untersuchungen eine gesteigerte BMPR2- und p-SMAD1/5/8-Expression in pulmonalarteriellen Gefäßwänden in Kombination mit einer verringerten Gefäßmuskularisierung. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 5-1 übersichtlich zusammengefasst.

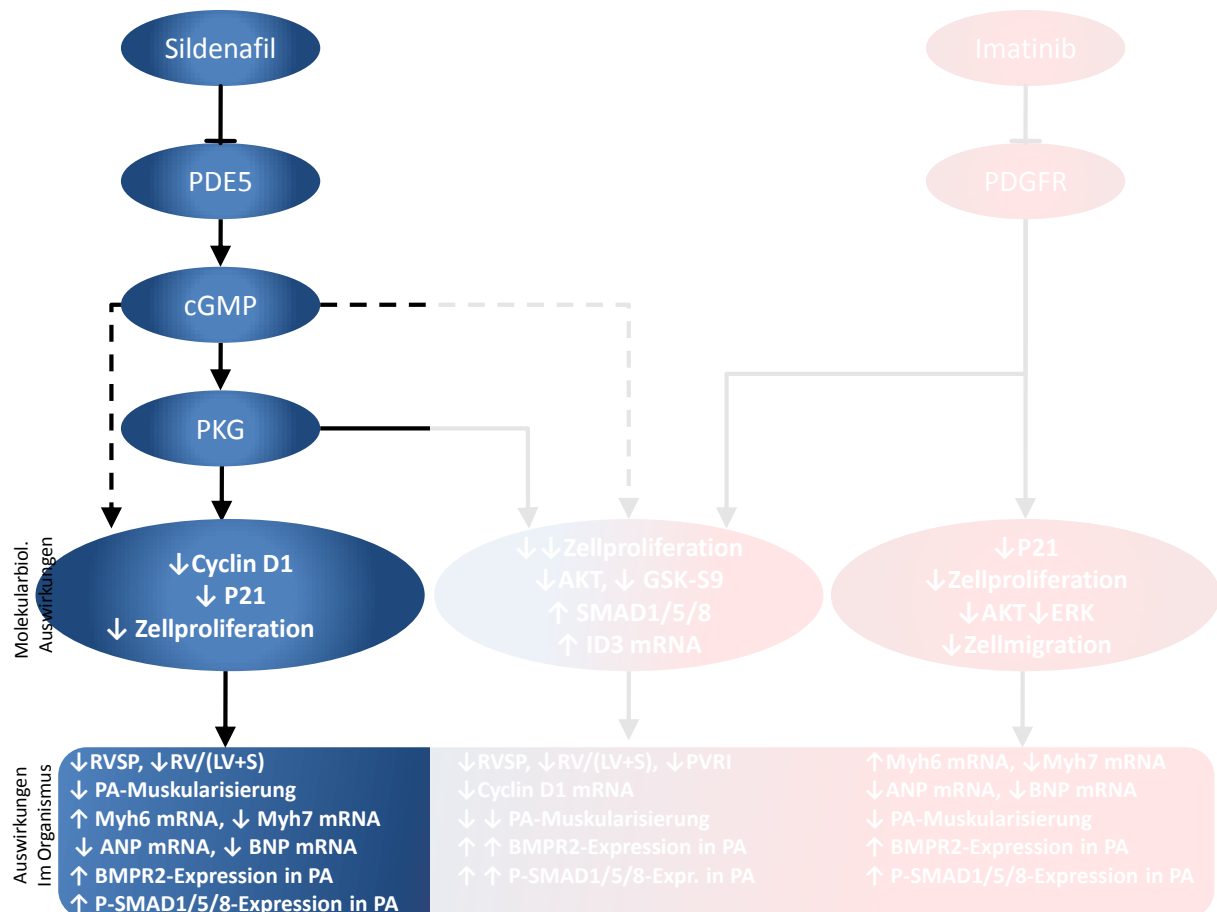


Abbildung 5-1: Graphische Zusammenfassung der Auswirkungen einer Sildenafilbehandlung auf humane SMCs, sowie den Organismus im MCT-Rattenmodell. PDE5: Phosphodiesterase 5, cGMP: cyclisches Guanosinmonophosphat; PKG: Proteinkinase G, Cyclin D1: Proteinkonzentration von Cyclin D1, Myh6/Myh7: schwere α -/ β -Kette Myosin-mRNA, ANP: atriale Natriuretische Peptid mRNA im Rattenherz, BNP: "brain" Natriuretische Peptid-mRNA im Rattenherz, RVSP: Rechtsventrikulärer systolischer Druck, RV/(LV+S): Masse des rechten Ventrikels in Relation zu Masse von linkem Ventrikel plus Septum, PA: Pulmonalarterien, BMPR2: „Bone morphogenetic Receptor“ 2, SMAD: „Small body size protein“/„Mothers against decapentaplegic“, ↓: verringerte Konzentration/verminderte Aktivität, ↑: erhöhte Konzentration/gesteigerte Aktivität.

5.2. Imatinib

Imatinib wurde ursprünglich als Krebsmedikament entwickelt, wo es die Onkogen-Tyrosinkinase Bcr-Abl hemmen sollte. Es stellte sich jedoch heraus, daß Imatinib durch Blockieren des PDGF-Rezeptors auch das Krankheitsbild der experimentellen pulmonalen Hyperonie verbessern konnte (60), (205). Diese Beobachtung wurde bereits in mehreren klinischen Einzelstudien mit PAH-Patienten im Endstadium bestätigt (206), (207), (208), (209), (210), (211).

5.2.1. Imatinib hemmt die Proliferation pulmonal-arterieller glatter Muskelzellen

Die Behandlung von HPASMCs mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib führte zu einer signifikanten, konzentrationsabhängigen Reduktion der Zellproliferationsrate (Abbildung 4-1). In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen ist eine ausgeprägtere Reduktion durch Imatinib unter PDGF-Stimulation auf den nahezu identischen Wert von nicht stimulierten Zellen (Abbildung 4-1 B) deutlich zu erkennen. Dieser Effekt fiel bei Stimulation mit FCS deutlich schwächer aus (Abbildung 4-1 A). Dieses Ergebnis bestätigt die Untersuchungen von Schermuly *et al.*, daß der Wachstumsfaktor PDGF für die Proliferation dieser Zellen eine wichtige Rolle spielt (60). Dies zeigt aber auch, daß noch weitere Wachstumsfaktoren und andere Substanzen, welche in FCS enthalten sind, eine wichtige Rolle bei der Stimulation dieser Zellen - und damit vermutlich auch im Krankheitsverlauf selbst - spielen.

Im Vergleich zu einer Behandlung mit Sildenafil übte eine 24-stündige Inkubation mit Imatinib nur einen marginalen Einfluß auf die Konzentration von Cyclin D1 aus (Abbildung 4-4 A), führte jedoch zu einer signifikanten Reduktion der Konzentration des Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitors p21 (Abbildung 4-4 B). Die möglichen Auswirkungen verringerter p21-Konzentration wurden bereits in Abschnitt 5.1.2 erläutert. Ausgehend von der Tatsache, daß Imatinib die Zellproliferation nachweislich hemmt, kann hier ebenfalls davon ausgegangen werden, daß die Verringerung der p21-Konzentration eine Förderung der Apoptoserate zur Folge hat (182).

5.2.2. Einfluß von Imatinib auf die Proteinphosphorylierung proliferationsassoziierter Kinasen, sowie auf die mRNA-Expression und Zellmotilität

Deutlich zu erkennen ist, daß eine Behandlung mit Imatinib bei allen untersuchten Proteinen keine signifikanten Veränderungen des Phosphorylierungsgrades unter FCS-Stimulation hervorruft – die einzige Ausnahme stellt AKT dar, welches eine deutlich verringerte Aktivität bei einer Behandlung mit 5 µM Imatinib aufwies. AKT ist Teil der am meisten aktivierten Signalwege für Proliferation und Zellüberleben in Krebs (212), (213) und spielt eine zentrale Rolle in der Signalweiterleitung von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und anderen zellulären Stimuli (214). Es fördert das Überleben der Zelle, indem AKT die Funktionen proapoptotischer Proteine und Prozesse blockiert (214). Somit begünstigt eine Behandlung mit Imatinib die Apoptose durch Inaktivierung von AKT.

Dies zeigt einerseits, daß Imatinib keine direkte Wirkung auf den SMAD- oder den antagonistischen TGF-β-Signalweg ausübt. Andererseits ist bekannt, daß Proteinkinasen wie AKT (215), (216), (217) und ERK (216), (217) durch PDGF phosphoryliert, also aktiviert werden. Signalwege verlaufen jedoch nicht strikt linear, sondern interagieren auch mit anderen Signalwegen auf komplexe Art und Weise,

so daß ein Ergebnis auf mehreren Wegen zu Stande kommt. Beispielsweise kann AKT Phosphoinositid 3-kinase- (PI3-K-) abhängig, als auch PI3-K-unabhängig über cAMP-konzentrationsfördernde Stoffe, wie Forskolin, Chlorophenylthio-cAMP, Prostaglandin-E1 oder 8-Bromo-cAMP, sowie PKA aktiviert werden (218), (219), (220). Obwohl AKT durch Imatinib gehemmt wird, kann in diesem Fall angenommen werden, daß die Inhibition des PDGF-Signalwegs durch einen anderen im FCS enthaltenen Wachstumsfaktor und entsprechenden nachgeschalteten Signalweg insofern kompensiert werden kann, daß zumindest ERK dennoch phosphoryliert wird. Unterstützt wird diese These durch die Resultate der Versuche mit PDGF-Stimulation (Abbildung 4-6 D und E). Da hier kein alternativer Stoffwechselweg durch einen zweiten Wachstumsfaktor aktiviert wird, kann die Phosphorylierung der Tyrosinkinasen ERK und AKT durch die Behandlung mit Imatinib und die daraus resultierende Inhibition des PDGF Signalwegs verhindert werden.

Untersuchungen der mRNA-Konzentration nach 24-stündiger Behandlung mit Imatinib zeigten auf, daß der Tyrosinkinaseinhibitor keinen Einfluß auf die mRNA-Level der R-SMADS 1/5/8 und SMAD3, der Rezeptoren ACVR2a, BMPR1a, BMPR1b und BMPR2, sowie der SMAD-Zielgene ID1, ID2 und ID3 besitzt.

Die Analyse der „Scratch“-Assays ließ erkennen, daß eine Stimulation mit PDGF einen deutlichen Anstieg der Zellmigrationsrate zur Folge hatte. Eine Hemmung des PDGF-Signalwegs konnte diesen Effekt wiederum umkehren, womit gezeigt werden konnte, daß ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Aktivität bzw. Hemmung des PDGF-Signalwegs und der Migrationsrate humaner PSMCs besteht. Es ist bereits bekannt, daß PDGF sich nicht nur förderlich auf die Poliferation, sondern auch die Migration von PSMCs auswirkt (221), daher ist es nicht verwunderlich, daß eine Hemmung dieses Signalwegs ebenso die Migration dieser Zellen hemmt.

5.2.3. Imatinib wirkt im MCT Rattenmodell primär auf molekularer Ebene und in pulmonalarteriellen Gefäßen

Im Vergleich zur Behandlung mit Sildenafil zeigte keine der hämodynamischen Messungen im MCT Rattenmodell eine deutliche Veränderung durch die Behandlung mit 50mg/kg/d Imatinib. Weder der rechtsventrikuläre systolische Druck, die Ausbildung einer Rechtsherzhypertrophie, noch der pulmonalvaskuläre oder systemische Widerstandsindex wurden durch Imatinib signifikant beeinflusst. Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen, da für diesen Versuchsansatz eine subtherapeutische Dosis angesetzt wurde, um bei den nachfolgend beschriebenen Kombinationsversuchen eine Wirkungssteigerung nachweisen zu können. Mit der für einen signifikanten Effekt notwendigen Dosis von 100 mg/kg/d Imatinib erhielten Schermuly *et al.* bei

der Untersuchung des Rechtsventrikulären Drucks (60) und Lungengewebes (222) im MCT Rattenmodell signifikante Veränderungen.

Im Gegensatz hierzu führte die Behandlung mit Imatinib auf molekularer Ebene zu deutlichen Verbesserungen des Krankheitsverlaufs. In den Herzen der mit 50 mg/(kg*d) Imatinib behandelten Sprague-Dawley Ratten konnte eine signifikante Steigerung der Schwere Kette 6 Myosin mRNA-Konzentration und eine Reduktion der mRNA des schwere Kette 7 Myosins nachgewiesen werden. Ebenso trat in der Imatinib-behandelten Gruppe eine signifikante Reduktion der Konzentration atrialer und B-Typ natriuretischer Peptid-mRNA auf. Lediglich auf Cyclin D1 zeigte Imatinib keinen Einfluß.

Deutliche Veränderungen waren ebenso in den histologische Analysen in kleinen Blutgefäßen der Rattenlungen nachzuweisen. Die Behandlung mit Imatinib führte in den untersuchten Proben zu einer deutlichen Abnahme der Gefäßwanddicke, die jedoch tendenziell weniger markant ausfiel, als die Reduktion in den Sildenafil-behandelten Proben. Die BMPR2- als auch die p-SMAD1/5/8-Expression zeigte sich im Vergleich zu den Placebo-behandelten Tieren deutlich erhöht, die Behandlung mit Imatinib zeigte hierbei einen marginal stärkeren Effekt als die mit Sildenafil.

5.2.4. Zusammenfassung Imatinib

Mittels der durchgeführten Zellkulturversuche konnte nachgewiesen werden, daß eine Behandlung mit Imatinib die Proliferation von HPASMCs hemmt und die Konzentration von p21 verringert. Beides läßt des Schluß zu, daß durch Imatinib der Zellzyklus unterbrochen und die Apoptose begünstigt wird. Ebenso konnte nachgewiesen werden, daß durch Imatinib die AKT-Phosphorylierung und - unter Stimulation mit PDGF - die ERK-Phosphorylierung gehemmt werden, was einen direkten Zusammenhang zwischen Zellproliferation, der aktivierenden Rolle des PDGF Signalwegs und den beiden Kinasen belegt. Außerdem konnte gezeigt werden, daß der PDGF Signalweg bei der Migration von HPASMCs eine wichtige Rolle spielt. Die Migration dieser Zellen konnte mittels einer Behandlung mit Imatinib signifikant gehemmt werden.

Ähnlich dem Sildenafil erhöht Imatinib die Konzentration an Myh6-mRNA und senkt die Konzentration an Myh7-mRNA im Herzen von MCT-behandelten Ratten. Auch verringert die Behandlung mit diesem PDGF-Rezeptorinhibitor die Konzentration von ANP und BNP mRNA in diesen Rattenherzen, was verringerten Organstreß bedeutet. Schließlich steigert Imatinib die BMPR2- und p-SMAD1/5/8-Expression in pulmonalarteriellen Gefäßwänden im MCT Rattenmodell, wobei die Muskularisierung der Gefäßwände verringert wurde. All diese Beobachtungen sind in Abbildung 5-2 übersichtlich zusammengefasst.

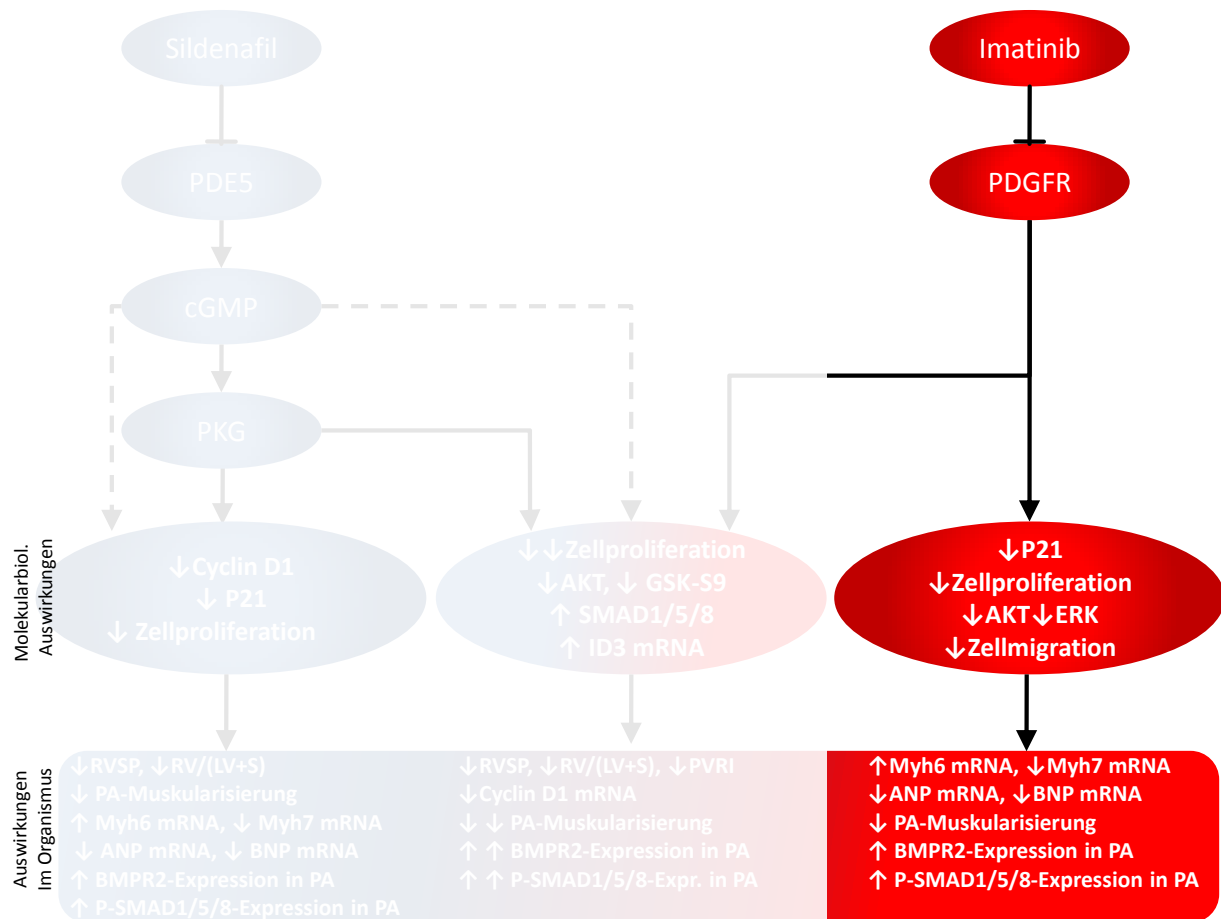


Abbildung 5-2: Graphische Zusammenfassung der Auswirkungen einer Imatinibbehandlung auf humane PSMCs, sowie den Organismus im Rattenmodell. Myh6/Myh7: schwere α -/ β -Kette Myosin-mRNA im Rattenherz, ANP: Atriale Natriuretische Peptid mRNA im Rattenherz, BNP: B-Typ Natriuretische Peptid-mRNA im Rattenherz, AKT: Proteinkinase B-Aktivität, GSK-3 β : Glykogen Synthase Kinase 3 β -Aktivität, PDGFR: "Platelet derived Growth Factor" Rezeptor, ERK: "Extracellular Regulated Kinase"-Aktivität, PA: Pulmonalarterien, BMPR2: „Bone morphogenetic Receptor“ 2, SMAD: „Small body size protein“/„Mothers against decapentaplegic“, ↓: verringerte Konzentration/verminderte Aktivität, ↑: erhöhte Konzentration/gesteigerte Aktivität.

5.3 Die Kombination von Sildenafil und Imatinib

Wie in Abschnitt 2.2.5.4 bereits erläutert wurde, besteht das Ziel einer Kombinationsbehandlung in der Medizin darin, die größtmögliche Wirkung bei einem Minimum an Nebenwirkungen zu erzielen. Bei einer dauerhaften Einzelbehandlung mit Imatinib wird beispielsweise ein Zusammenhang mit linksventrikulärer Dysfunktion und Herzversagen vermutet (223). Bei einer Therapie, die hingegen auf zwei unterschiedliche Stoffwechselwege abzielt, wird durch die unterschiedlichen Wirkmechanismen der beiden verwendeten Medikamente ein additiver, oder idealerweise ein synergistischer Effekt erhofft (191), (224). Eine Kombination mit dem bereits erprobten Sildenafil hat u.a. das Ziel, einen vergleichbaren Behandlungseffekt mit einer geringeren Dosis Imatinib zu erreichen.

Tatsächlich ist die Kombinationstherapie im klinischen Alltag bereits zum Standard geworden, auch wenn die Anzahl an Studien, welche den Vorteil dieser Behandlung beweisen, begrenzt ist (153). In diversen Einzelstudien konnten bestätigende Ergebnisse zur Kombination von Prostanoiden, ERAs und PDE5-Inhibitoren, wie Sildenafil gesammelt werden (46),(153), (225), (226), (227), (228), jedoch erfordern aussagekräftige Ergebnisse die Durchführung größerer klinischer Studien (153).

5.3.1 Sildenafil und Imatinib hemmen synergistisch die Proliferation von humanen PSMCs, direkte Stimulation mit BMP4 führt ebenfalls zu einer Reduktion der Zellteilungsrate

Vergleiche der Zellproliferationsraten (Abbildung 4-1) zeigten, daß eine Kombinationsbehandlung mit Sildenafil und Imatinib eine deutliche Reduktion der Zellteilungsrate im Vergleich zu entsprechenden Einzelbehandlungen zur Folge hatte. Dieser Effekt konnte ebenso deutlich auf Proteinebene nachgewiesen werden, wo eine Kombination von Sildenafil und Imatinib die Konzentration des Zellzyklusregulators Cyclin D1 und des Zellzyklusinhibitors p21 deutlich stärker reduzierte, als eine Einzelbehandlung mit Sildenafil oder Imatinib.

Die Stimulation humaner PSMCs mit BMP4 führte zu einer Hemmung der Zellproliferation, wobei die Wirkung der verwendeten Konzentration von ihrer Intensität in etwa dem Effekt einer Behandlung mit 10 µM Sildenafil entsprach.

5.3.2 Die Kombinationsbehandlung mit Sildenafil und Imatinib aktiviert den SMAD-Signalweg auf Proteinebene und hemmt Proliferationsfördernde Kinasen

Die Kombination von Sildenafil und Imatinib zeigte ebenso wie bereits die Einzelbehandlungen mit diesen Medikamenten keinen Einfluss auf die mRNA-Konzentrationen der Rezeptoren ACVR2a, BMPR1a, BMPR2 und der R-SMADs SMAD1, SMAD5, SMAD8 und des antagonistischen SMAD3. Auch eine direkte Aktivierung des SMAD-Signalwegs mittels BMP4 führte zu keiner Veränderung der mRNA-Konzentrationen. Im Vergleich hierzu zeigten jedoch die mRNA des Zielgens ID3 einen signifikanten Anstieg durch Stimulation mit BMP4, der durch additionelle Behandlung mit Sildenafil und Imatinib signifikant gesteigert werden konnte. Obwohl die Behandlung mit BMP4 allein bei dem Zielgen ID2 zu keiner eindeutigen Erhöhung der mRNA-Konzentration führte, konnte das mRNA-Level durch zusätzliche Behandlung mit Sildenafil und Imatinib im Vergleich zu unbehandelten Zellen ebenfalls erheblich gesteigert werden. Zusammengefasst bedeutet dies, daß eine Kombinationsbehandlung mit Sildenafil und Imatinib allein oder in Verbindung mit direkter Aktivierung des SMAD-Signalwegs durch BMP4 keine Auswirkung auf die Mitglieder des SMAD-

Signalwegs selbst hat. Lediglich die mRNA Konzentrationen der Zielgene sind betroffen, jedoch üben auch hier Sildenafil und Imatinib nur einen Einfluß in Verbindung mit BMP4 aus.

Auf Proteinebene zeigten sich bei den beiden verwendeten Stimulationen deutlich abweichende Ergebnisse. Unter Stimulation mit FCS konnte durch die Kombination von Sildenafil und Imatinib eine signifikante Steigerung der SMAD1/5/8-Phosphorylierung erreicht werden. Ebenso führte die Kombinationsbehandlung bei GSK-3 β an Serinrest 9 zu einer signifikanten Steigerung des Phosphorylierungsgrades, sowie an Tyrosinrest 216 zu einer Reduktion der Proteinphosphorylierung.

GSK3 β (Glycogen Synthase Kinase-3 beta) ist eine in allen Eukaryoten vorkommende, hoch konservierte Serin/Threonin-Proteinkinase. Obwohl sie ursprünglich als ein Regulator des Glykogenstoffwechsels identifiziert wurde, agiert GSK-3 β auch bei vielen Stoffwechselwegen als ein nachgeschalteter Stoffwechselregulator (229), (230), (231). In ruhenden, nicht stimulierten Zellen ist GSK-3 β konstitutiv aktiv und wird während diverser zellulärer Antworten deaktiviert (232). So führt beispielsweise eine PI3K-induzierte AKT-Aktivierung zur Phosphorylierung des Serinrests 9, was die Aktivität von GSK-3 β hemmt (229), (233). Zusätzlich kann die Aktivität von GSK-3 β durch Phosphorylierung von Tyrosinresten reguliert werden. Eine Phosphorylierung der Tyrosinreste führt zu einer Steigerung der Enzymaktivität (229). Ergebnisse der letzten Jahre lassen vermuten, daß die Aktivierung der GSK-3 β sich förderlich auf Proliferation und Zellüberleben in verschiedenen Krebsarten (234), als auch im vaskulären Remodeling auswirkt (235). Die gleichzeitige Phosphorylierungssteigerung an Serinrest 9 mit der abnehmenden Phosphorylierung an Tyrosinrest 216 besagt, daß sich die Kombinationsbehandlung mit Sildenafil und Imatinib inhibierend auf die GSK-3 β -Aktivität ausübt, was antiproliferativ wirkt und die Apoptose begünstigt.

ERK und SMAD3 zeigten schließlich eine signifikante Steigerung des Phosphorylierungsgrades bei Kombinationsbehandlung mit niedriger Sildenafilkonzentration, die jedoch durch Steigerung der Sildenafilkonzentration zurückging.

Bekannt ist, daß BMPR2 zwar gleichmäßig exprimiert wird, jedoch in Kombination mit einem Corezeptor, meistens BMPR1A, viele verschiedene Stoffwechselwege, wie p-SMAD1/5 (236), p-p38 (237), pERK, JNK und AKT/PI3K (238), (239) aktivieren kann. Diese zentrale Schaltstelle untersteht verschiedenen Regulationsmechanismen, die eine spezifische Antwort auf jeden Stimulus ermöglichen. Eine Möglichkeit, die Stoffwechselaktivität zu regulieren, ist die Hybridisierung verschiedener Rezeptoren, die so auch unterschiedliche Stoffwechselwege ansprechen können. Beispielsweise kann TGF- β mit ALK1, ALK2 oder ALK3 einen heteromeren Komplex mit dem TGF- β -Rezeptor ALK5 eingehen (100),(101), so daß in verschiedenen Zelltypen SMAD1/5/8 und SMAD2/3 gleichzeitig aktiviert werden können (103),(104) und demzufolge die gesteigerte SMAD3-

Aktivität vermutlich ebenso eine Reaktion auf die Aktivierung des BMPR2 ist, wie die Aktivierung von SMAD1/5/8. Bei höheren Konzentrationen an Sildenafil in der Kombinationsbehandlung wäre es denkbar, daß die Inaktivierung, die bei SMAD3 und ERK beobachtet wurde, die logische Reaktion auf den verstärkten SMAD1/5/8-Stimulus darstellt. Dies könnte einerseits durch Ansprechen weiterer Rezeptorkomplexe, die erst bei höheren Sildenafilekonzentrationen aktiviert werden, geschehen oder mittels einer durch die SMAD1/5/8-Aktivierung selbst ausgelösten Kopplung.

Unter Stimulation mit PDGF führte die Kombinationsbehandlung mit Sildenafil und Imatinib bei keinem der untersuchten Proteine zu einer signifikanten Veränderung des Phosphorylierungsgrades. Der Anstieg der SMAD1/5/8-Phosphorylierung durch diese Kombinationsbehandlung ist lediglich marginal. Das lässt den Schluß zu, daß die Kombination von Sildenafil und Imatinib allein nicht ausreichend ist, um für eine Aktivierung des SMAD-Signalwegs zu sorgen. Stattdessen ist anzunehmen, daß eine Substanz in FCS enthalten ist, die den Effekt der Kombinationsbehandlung von Sildenafil und Imatinib auf den SMAD1/5/8-Signalweg verstärkt, oder überhaupt erst möglich macht und bei PDGF-Stimulation fehlt. Diese Komponente muß in FCS in ausreichender Menge enthalten sein, um den dort beobachteten Phosphorylierungsanstieg hervorzurufen.

Ein mögliches Beispiel für solch ein Wechselspiel wäre die verstärkende Wirkung des Sildenafils auf BMP4: Morrel *et al.* haben herausgefunden, daß Sildenafil allein keinen Einfluß auf die SMAD1/5/8-Phosphorylierung und damit den SMAD-Signalweg ausübt, dennoch aber die Auswirkung einer Stimulation mit BMP4 auf eben diesem Signalweg verstärken kann (129). Wie in Abbildung 4-6 B zu sehen ist, fördert BMP4 die SMAD1/5/8 Phosphorylierung signifikant. Allerdings kann BMP4 in diesem Fall ausgeschlossen werden, denn wäre im FCS enthaltenes BMP4 verantwortlich hierfür gewesen, hätte bereits eine Einzelbehandlung mit Sildenafil unter FCS-Stimulation die SMAD1/5/8-Phosphorylierung verstärkt. Da in Abbildung 4-5 B durch die Einzelbehandlung mit Sildenafil jedoch kein Anstieg der SMAD1/5/8-Phosphorylierung erfolgt ist, ist es unwahrscheinlich, daß es sich bei der unbekannten Komponente, die in FCS in ausreichender Menge enthalten zu sein scheint, tatsächlich um BMP4 handelt.

Die Ergebnisse der Migrationsuntersuchungen zeigten, daß durch die Kombinationsbehandlung mit Sildenafil und Imatinib im Vergleich zu einer Einzelbehandlung mit Imatinib eine leicht reduzierte Zellbeweglichkeit zu erkennen ist, die jedoch keine Signifikanz aufweist. Identische Ergebnisse wurden ebenso durch eine Kombinationsbehandlung mit Imatinib und 8-Br-cGMP bzw. 8-pCPT-cGMP erreicht. Es lässt sich zusammenfassen, daß eine synergistische Hemmung der Zellmigration durch die erkennbaren Tendenzen der Ansätze mit Imatinib und Sildenafil bzw. Imatinib und den cGMP-Analoga vermutet werden kann. Jedoch muß dies zunächst durch eine sensiblere Technik, beispielsweise einen Transmembran-Assay bestätigt werden. Eine direkte Aktivierung des SMAD-

Signalwegs durch BMP4 allein oder in Kombination mit PDGF führte zu keinerlei Auswirkungen auf die Zellmotilität (Vgl. Abbildung 4-11 B, C). Ebenso war kein Unterschied zwischen den Zellen, die bei PDGF-Stimulation mit Sildenafil und/oder Imatinib behandelt wurden und denen, die zusätzlich BMP4 erhielten, zu erkennen. Dieses Ergebnis entspricht nicht den Erwartungen, ist doch der Transkriptionsfaktor „peroxisome proliferator-activated receptor- γ “ (PPAR γ) als potentiell Ziel des durch den BMPR2 aktivierten Signalwegs bekannt (240), (241). PPARs sind ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren, die zu Nuklear-Rezeptor Superfamilie gehören. PPAR γ selbst kann indirekt mit Signalmolekülen interagieren um die Genexpression auch unabhängig von einer DNA-Bindung zu regulieren (242). So wirkt es beispielsweise auch inhibierend auf Phosphorylierung und Aktivierung der durch PDGFR- β aktivierten MAPK ERK (243), (244), welche wiederum an SMC-Proliferation und -Migration beteiligt ist (245), (246). Dennoch stehen die hier erhaltenen Ergebnisse nicht unbedingt im Widerspruch mit der Literatur, denn für den Nachweis der migrationshemmenden Wirkung von PPAR wurde nicht mit BMP4, sondern mit direkten PPAR γ -Liganden wie Rosiglitazon gearbeitet (246), wodurch PPAR γ möglicherweise deutlich besser angesprochen wird, oder andere relevante Stoffwechselwege beeinflusst werden als mit direkter Stimulation durch BMP4. Das lässt vermuten, daß, sofern eine Beeinflussung der Zellmotilität durch Sildenafil und Imatinib vorhanden ist, diese nicht (allein) durch Aktivierung des BMP-Signalwegs ausgelöst wird.

5.3.3 Die Kombination von Sildenafil und Imatinib verbessert signifikant das Krankheitsbild der PH im MCT-Rattenmodell

Im MCT Rattenmodell zeigte die Kombinationsbehandlung mit Sildenafil und Imatinib eine eindeutige Verbesserung des Krankheitsbildes. Der rechtsventrikuläre, systolische Druck, der in den Tieren, die eine Kombinationstherapie erhielten, gemessen wurde, lag nicht nur signifikant unter dem der Placebo-behandelten und Imatinib-behandelten Tiere, sondern auch geringfügig unter dem der Tiere, welche mit Sildenafil allein behandelt wurden. Bei $39,9 \pm 3,3$ mmHg zeigten die kombinationsbehandelten Individuen einen Wert, der nur unwesentlich über dem gesunder Tiere ($30,0 \pm 0,9$ mmHg) lag. Vergleichbare Ergebnisse konnten ebenso in den Untersuchungen der Rechtsherzhypertrophie ermittelt werden. Auch hier lag das Ergebnis der Kombinationsbehandlung mit einem Verhältnis des rechten Herzens zu linkem Herz plus Septum von $0,36 \pm 0,025$ signifikant unter dem der Tiere, die mit einem Placebo oder Imatinib allein behandelt wurden, sowie unter dem der Sildenafil-behandelten Gruppe und damit nahe am Wert der Kontrollgruppe ($0,26 \pm 0,007$). Obwohl beide Medikamente als Einzelbehandlung keine Veränderung des pulmonalvaskulären Widerstandsindex bewirken konnten, führte auch bei dieser Untersuchung die Kombinationsbehandlung mit einem Wert von $1,2 \pm 0,11$ (gemessen in mmHg min/ml pro 100 g

Körpermasse) zu einer Verbesserung des Krankheitsbildes auf nahezu dasselbe Niveau gesunder Tiere, welche einen Wert von $1,1 \pm 0,12$ aufwiesen.

All diese morphologischen Veränderungen führten jedoch nicht zu einer Veränderung des systemisch-vaskulären Widerstandsindex, was bedeutet, daß Sildenafil und Imatinib ihren Einfluß fast ausschließlich auf pulmonale, aber nicht auf systemische Gefäße ausüben.

Auf molekularer Ebene konnte nachgewiesen werden, daß die Behandlung von MCT-Ratten mittels Sildenafil und Imatinib eine deutliche Reduktion der Cyclin D1 mRNA im Herzen im Vergleich zu Placobo- oder Imatinib-behandelten Tieren zur Folge hat. Die verringerte Zellteilungsrate bedeutet, daß durch die Kombinationsbehandlung mit Sildenafil und Imatinib das Gewebe der rechten Herzkammer nicht mehr gezwungen ist, den ständig steigenden pulmonalen Widerstand im Krankheitsverlauf mittels Bildung neuer Muskelzellen zur Erhöhung des pulmonalvaskulären Drucks zu kompensieren.

Histologische Untersuchungen zeigten zudem, daß die Kombination von Sildenafil und Imatinib im MCT Rattenmodell zu einer deutlichen Steigerung der BMPR2- und p-SMAD1/5/8-Konzentration führte, die stärker ausfiel als die Konzentrationssteigerung der Einzelbehandlungen. Zudem zeigte sich eine im Vergleich zu den MCT/Placebo-behandelten Tieren eine deutlich verringerte Muskularisierung der Pulmonalarterien, die etwa dem Muskularisierungsgrad gesunder Tiere entsprach.

5.3.4 Zusammenfassung der Auswirkungen einer Kombinationstherapie mit Sildenafil und Imatinib

Durch Kombinationsbehandlung mit Sildenafil und Imatinib konnte die Zellproliferation von HPASMCs signifikant stärker gehemmt werden, als dies mit einer Einzelbehandlung mit Imatinib möglich war. Außerdem aktiviert nur die Kombination aus beiden Substanzen den SMAD1/5/8-Signalweg unter FCS-Stimulation und hemmt die AKT-Aktivität, als auch die GSK-3 β -Aktivität, was sich ebenfalls antiproliferativ auswirkt. Ebenso zeigten die Ergebnisse der RT-PCR, daß die Behandlung mit Sildenafil und Imatinib in Kombination mit BMP4 signifikant die Konzentration von ID3-mRNA in Relation zur den Proben steigert, die mit BMP4 allein behandelt wurden.

Im MCT-Rattenmodell führte die Kombinationsbehandlung zu einem verringerten RVSP, einer Verbesserung der Rechtsherzhypertrophie und einem gesenkten pulmonalvaskulären Widerstandsindex, ohne aber den systemischen Widerstandsindex zu beeinflussen. In den Herzen so

behandelter Tiere konnte zudem eine signifikant reduzierte Cyclin D1 mRNA-Konzentration nachgewiesen werden, während die Pulmonalarterien dieser Individuen neben einem verringerten Muskularisierungsgrad eine im Verhältnis zu einer Einzelbehandlung gesteigerte BMPR2- und pSMAD-1/5/8-Konzentration aufwiesen. Die Resultate einer Behandlung mit Sildenafil, Imatinib oder einer Kombinationsbehandlung beider Substanzen wurden in Abbildung 5-3 gegenübergestellt.

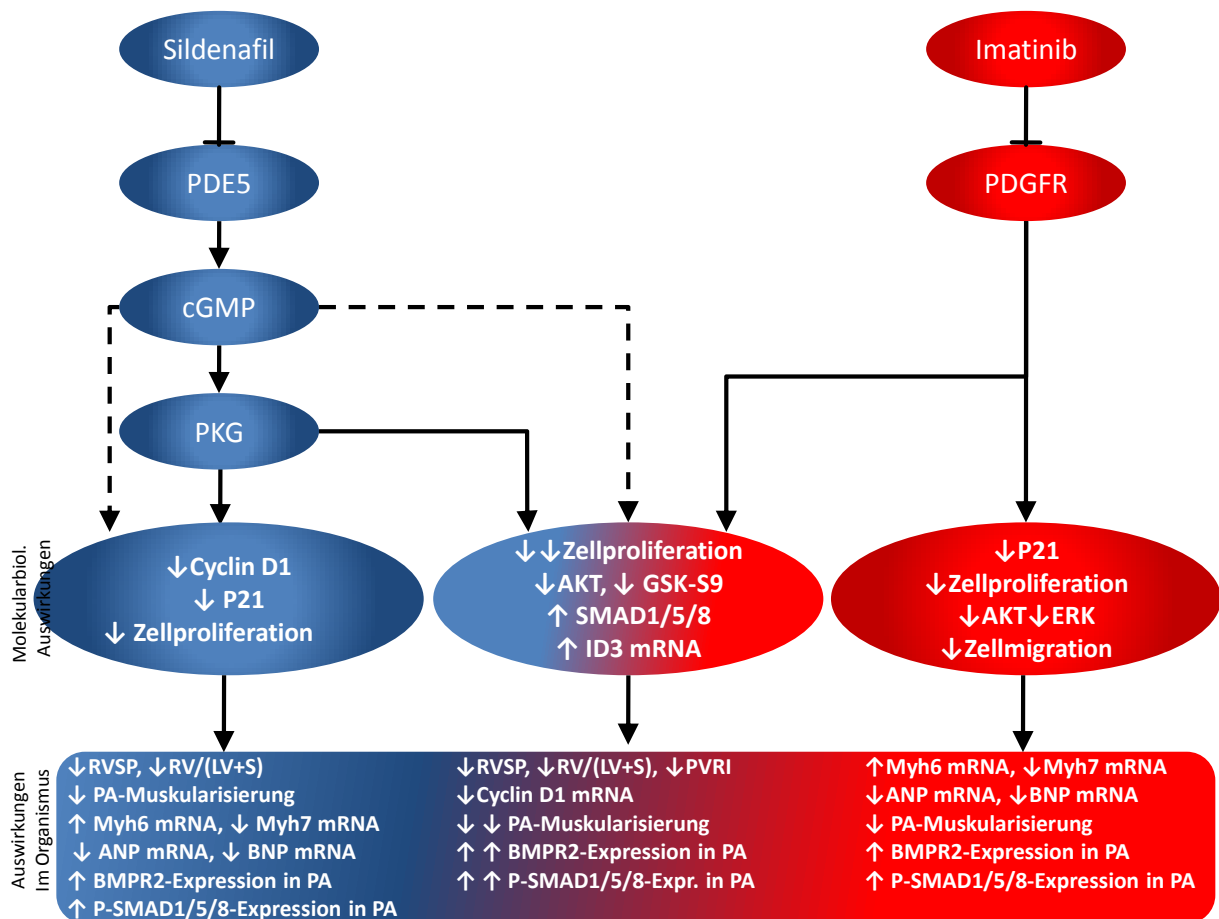


Abbildung 5-3: Graphische Zusammenfassung der Auswirkungen einer Kombinationsbehandlung mit Sildenafil und Imatinib auf SMCs, sowie den Organismus. PDE5: Phosphodiesterase 5, cGMP: cyclisches Guanosinmonophosphatkonzentration, PKG: Proteinkinase G-Aktivität, Cyclin D1: Proteinkonzentration von Cyclin D1, Myh6/Myh7: schwere α -/ β -Kette Myosin-mRNA im Rattenherz, ANP: Atriale Natriuretische Peptid mRNA im Rattenherz, BNP: "brain" Natriuretische Peptid-mRNA im Rattenherz, RVSP: Rechtsventrikulärer systolischer Druck, RV/(LV+S): Masse des rechten Ventrikels in Relation zu Masse von linkem Ventrikel plus Septum, AKT: Proteinkinase B-Aktivität, GSK-3 β : Glycogen Synthase Kinase 3 β -Aktivität, PDGFR: Platelet derived Growth Factor Receptor; ERK: "Extracellular Regulated Kinase"-Aktivität; PA: Pulmonalarterien, BMPR2: „Bone morphogenetic Receptor“ 2, SMAD: „Small body size protein“/„Mothers against decapentaplegic“, ID3: „Inhibitor of DNA binding Protein“ 3, ↓: verringerte Konzentration/verminderte Aktivität, ↑: erhöhte Konzentration/gesteigerte Aktivität.

5.4 Fazit

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, daß ein direkter Zusammenhang zwischen der Aktivierung des SMAD-Signalwegs und dem Verlauf des Krankheitsbildes einer PAH besteht. Die Kombinationsbehandlung mit Sildenafil und Imatinib zeigt einen eindeutigen synergistischen Effekt, der einerseits auf molekularer Ebene (Abbildung 4-1, Abbildung 4-4, Abbildung 4-5), jedoch ebenso im lebenden Organismus (Abbildung 4-12, Abbildung 4-13, Abbildung 4-14, Abbildung 4-15) deutlich nachgewiesen werden konnte. Die hier gezeigten Ergebnisse stützen daher nicht nur frühere Studien, in denen ein Zusammenhang zwischen einem BMPR2-Defekt und der Entwicklung einer PAH aufgezeigt wurde, auch konnten die hier erworbenen Daten den Umkehrschluß bestätigen, daß die Aktivierung des BMP-Signalwegs gegen das Fortschreiten einer PAH opportuniert (Abbildung 4-7). Desweiteren konnte belegt werden, daß die Kombination beider Medikamente nicht nur antiproliferative Eigenschaften aufzeigt, sondern auch die Expression des relevanten BMP-Rezeptors 2 fördert, sowie das nachgeschaltete p-SMAD1/5/8 im MCT Rattenmodell aktiviert (Abbildung 4-14, Abbildung 4-15) und so das allgemeine Krankheitsbild auf molekularer (Abbildung 4-13) als auch auf physiologischer Ebene (Abbildung 4-12) maßgeblich positiv beeinflusst.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, daß der BMP- bzw. SMAD-Signalweg eine zentrale Rolle in der Entwicklung einer pulmonalerteriellen Hypertonie einnimmt, jedoch die gesamten stoffwechselphysiologischen Auswirkungen von Sildenafil und Imatinib bis dato noch nicht vollständig aufgeklärt werden konnten. Allerdings konnte nachgewiesen werden, daß ein eindeutiger, direkter Zusammenhang zwischen dem synergistischen Effekt, den eine Kombinationsbehandlung von Sildenafil und Imatinib auf den Verlauf einer PAH ausübt, und der Aktivierung des SMAD-Signalwegs besteht.

5.5 Aussicht

Die hier erworbenen Ergebnisse bestätigen, daß Sildenafil über Aktivierung der PKG in Kombination mit Imatinib einen antiproliferativen Einfluß auf PSMCs ausübt. Auch konnte mit den hier durchgeführten Versuchen gezeigt werden, daß diese antiproliferative Wirkung des Sildenafil über PKG vermittelt wird. Jedoch lies dies keine genauen Aussagen zu, ob noch weitere Wirkungswege, beispielsweise über cGMP-abhängige Ionenkanäle oder PDEs involviert sein können. Zu testen wäre dies mittels eines Versuchsaufbaus, entsprechend den in Abbildung 4-5 durchgeführten Western Blots. Jedoch würde ein spezifischer PKG-Aktivator (beispielsweise 8-Br-cGMP oder 8-pCPT-cGMP) anstelle des Sildenafil erkennen lassen, ob die synergistische Wirkung auf diese Kinasen auch über die selektive Aktivierung der PKG anstelle einer Behandlung mit Sildenafil vermittelt wird, oder ob der Einfluß von cGMP auf PDEs und Ionenkanäle eine ebenso wichtige Rolle in den untersuchten Stoffwechselwegen spielt.

Ein weiterer, interessanter Ansatz wäre eine erneute Versuchsserie zur Zellmotilität, um die in dieser Arbeit nicht vollends geklärte Fragestellung aufzuarbeiten. Ein Transmembran-Assay sollte für diese Aufgabenstellung exakte Werte liefern. Auch wäre überlegenswert, zur Stimulation FCS anstelle von PDGF zu verwenden, da in den Versuchen auf Proteinebene, als auch in den Proliferationsassays der Kombinationseffekt von Sildenafil und Imatinib bei FCS-Stimulation deutlicher ausfiel.

Schließlich bliebe die Frage zu klären, aus welchem Grund die Kombination von Sildenafil und Imatinib unter der Stimulation mit FCS deutlichere Ergebnisse als unter PDGF-Stimulation lieferte. Da jedoch das verwendete Kälberserum aus einer riesigen Anzahl unbekannter Substanzen besteht, gestaltet sich diese Aufgabe als schwierig. Obgleich eine Analyse aller Inhaltsstoffe weder sinnvoll noch möglich ist, könnten Ergebnisse in dieser Richtung neue Einblicke in das Krankheitsbild liefern. Lohnend könnten hier Versuche zur Zellproliferation unter der Verwendung anderer Wachstumsfaktoren sein, aber auch Versuchsansätze mit anderen BMP-Liganden wären möglich. Diese würden andere Rezeptor-Dimere ansprechen als BMP4, was wiederum neue Erkenntnisse liefern könnte.

6. Zusammenfassung

Pulmonalerterielle Hypertonie (PAH) ist eine schwerwiegende Erkrankung mit hoher Morbiditäts- und Mortalitätsrate. Der Verlauf dieser Krankheit ist charakterisiert durch ein umfassendes pulmonalvaskuläres *Remodeling*, sowie einen damit verbundenen erhöhten pulmonalerteriellen Blutdruck, Gefäßwiderstand, und den Verlust kleinerer pulmonaler arterieller Gefäße. Betroffen sind alle Schichten der Gefäßwand, jedoch nehmen pulmonalerterielle glatte Muskelzellen eine primäre Rolle in diesem Prozeß ein. Patienten, die an PAH leiden, zeigen oft eine Störung des SMAD-Signalwegs. In Patienten mit familiärer PAH ist häufig eine Mutation des assoziierten BMP-Rezeptors 2 (BMPR2) nachzuweisen. Zusätzlich konnten in Patienten mit pulmonaler arterieller Hypertonie deutlich erhöhte Aktivitäten des "Platelet-derived-Growth-Factor"- (PDGF-) Signalwegs, sowie der Phosphodiesterase-5 (PDE5) gemessen werden.

Der PDE5-Inhibitor Sildenafil ist bereits eine etablierte Medikation für pulmonalerterielle Hypertonie und sorgt durch eine erhöhte Akkumulation von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) für eine Vasodilatation und eine Reduktion der Zellproliferationsrate. Im Vergleich hierzu gilt der PDGF-Rezeptor-Inhibitor Imatinib als neuartige, experimentelle Behandlung, die in ersten Tests bereits vielversprechende Ergebnisse zeigte.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der molekularbiologischen, sowie physiologischen Auswirkungen der Kombinationsbehandlung dieser beiden Medikamente, insbesondere in Hinblick auf gemeinsame Auswirkungen auf den SMAD- ("MAD = Mothers against decapentaplegic gene; Sma = small body size protein) Signalweg, sowie die damit assoziierten Veränderungen in Zellzyklus, Proteinexpression, Proliferation und die damit verbundenen histologischen und physiologischen Veränderungen.

Hauptobjekt dieser Arbeit waren pulmonalerterielle glatte Muskelzellen (PASMCs), da dieser Zelltyp eine zentrale Rolle in der Entwicklung einer PAH spielt. Mittels Thymidininkorporationsassay wurde durch eine Behandlung mit Sildenafil und Imatinib eine Reduktion der Zellproliferation nachgewiesen. Die Kombination beider Medikamente führte zu einem synergistischen Effekt auf diese Proliferationsreduktion. Anschließende Untersuchungen mit cGMP-Analoga zeigten, daß die Wirkung des Sildenafils auf die Zellproliferation durch die cGMP-abhängige Proteinkinase 1 (PKG) vermittelt wurde.

Begleitet wurde diese Beobachtung durch eine Verringerung der Konzentration des Zellzyklusregulators Cyclin D1, was eine Unterbrechung des Zellzyklus bestätigt. Gleichzeitig lies die geringere Expression des Zellzyklusinhibitors p21 eine gleichzeitige Begünstigung der Apoptose der untersuchten Zellen vermuten. Untersuchungen der Proteinphosphorylierungen mittels Western Blot

deckten auf, daß durch die Kombinationsbehandlung mit Sildenafil und Imatinib eine Zunahme der SMAD1/5/8-Aktivität stattfand, während die proliferations- und zellüberlebensfördernden Kinasen Proteinkinase B (AKT), extracellular-signal regulated Kinase (ERK) und Glykogen-Synthase-Kinase-(GSK-) 3 β durch die Kombinationsbehandlung inaktiviert wurden. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, daß eine direkte Aktivierung mittels BMP4-Stimulation einen ähnlichen antiproliferativen Einfluß besitzt, wie eine Behandlung mit Sildenafil oder Imatinib. Das bedeutet, die verringerte Aktivität des SMAD-Signalwegs ist nicht nur ein Symptom von PAH, sondern im Umkehrschluß kann eine Aktivierung dieses Signalwegs auch den Krankheitsverlauf positiv beeinflussen.

Die Untersuchungen an jungen Sprague-Dawley-Ratten deckten auf, daß vaskuläres Remodeling, welches 5 Wochen nach einmaliger Monocrotalin- (MCT-) Injektion durch histologische Präparation nachgewiesen wurde, verhindert werden konnte, indem die Tiere von Tag 21 bis Tag 35 nach der Injektion mit oral gegebenem Sildenafil und Imatinib (je 50mg/kg/d) behandelt wurden. Diese positiven Veränderungen gingen einher mit einer verstärkten Expression von BMPR2 und SMAD1/5/8 in den Gefäßwänden der mit Sildenafil und Imatinib behandelten Tiere, wobei eine Kombinationsbehandlung einen stärkeren Effekt zeigte als eine Behandlung mit Sildenafil oder Imatinib allein. In Begleitung hierzu bildeten so behandelte Tiere auch eine deutlich verringerte Rechtsherzhypertrophie aus und zeigten im Verhältnis zu MCT-behandelten Tieren einen signifikant verringerten rechtsventrikulären systolischen Druck und pulmonalvaskulären Widerstandsindex (PVRI), ohne daß der systemisch vaskuläre Widerstandsindex (SVRI) merklich beeinflusst wurde. Zusätzlich konnten in den Herzen dieser Tiere deutlich verringerte Zellteilungsraten durch Messung der Konzentration von Cyclin D1 mRNA und reduzierter Organstreß an Hand reduzierter Konzentration an schwere β -Kette Myosin-mRNA (Myh7-mRNA), gesteigerter Konzentration an schwere α -Kette Myosin-mRNA (Myh6-mRNA), sowie leicht verringerten Mengen der B-Typ natriuretischen Peptid-mRNA (BNP-mRNA) nachgewiesen werden.

Diese Daten belegen, daß der SMAD-Signalweg im Krankheitsverlauf von PAH eine zentrale Rolle spielt und in Zukunft weitere Ansätze zu Behandlungsmöglichkeiten bietet. Obwohl noch viele Fragen zu klären sind, konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, daß dieser Signalweg durch Behandlung mit Sildenafil und Imatinib aktiviert wird und diese Aktivierung den molekularen und physiologischen Krankheitsverlauf auf vielfache Weise positiv beeinflusst.

7. Summary

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a severe disease with high morbidity and mortality. It is characterized by elevated pulmonary arterial pressure and pulmonary vascular resistance due to extensive vasoconstriction, comprehensive vascular remodeling, as well as loss of small pulmonary vessels. Pulmonary vascular remodeling involves all layers of the vessel wall, but pulmonary arterial smooth muscle cells play a major role in this process. Patients suffering from idiopathic PAH, often show a disturbance of the SMAD signaling pathway, and in patients with familial PAH mutations of the BMP receptor 2 (BMPR2) have been described. In addition, it is well-known that upregulated platelet-derived growth factor - (PDGF) signaling and increased phosphodiesterase-5 (PDE5) are key pathological factors in PAH.

The PDE5 inhibitor sildenafil is already an established medication for PAH and is proved to exhibit vasodilative and anti-proliferative effects by increasing levels of cyclic guanosine monophosphate (cGMP). In comparison, the PDGF receptor inhibitor imatinib is considered as a novel treatment which has already shown promising results in initial preclinical and clinical studies.

The aim of this study was to investigate the molecular and the physiological effects of the combination treatment of these two drugs, in particular in terms of common effects on SMAD (MAD = Mothers against decapentaplegic gene; Sma = small body size protein) signaling pathway, and the associated changes in cell cycle protein expression, proliferation, as well as the histological and physiological changes.

This work employed pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs), since this cell type plays a central role in the development of PAH. Via Thymidin incorporation assay, a reduction in cell proliferation was detected by treatment with sildenafil and imatinib. The combination of both drugs resulted in a synergistic effect on this reduction. Subsequent studies with cGMP analogs showed that the effect of sildenafil on the inhibition of cell proliferation is delivered by cGMP-dependent protein kinase 1 (PKG). This observation was supported by a reduction in the concentration of the cell cycle regulator Cyclin D1, confirming disruption of the cell cycle. Additionally, the lower expression of the cell cycle inhibitor p21 suggests a increase in apoptosis of the cells investigated. Studies of protein phosphorylation by Western Blot revealed that the combination treatment with sildenafil and imatinib results in an increase of SMAD1/5/8 activity, while the proliferation and cell survival-promoting kinases protein kinase B (AKT), extracellular-signal regulated kinase (ERK) and glycogen synthase kinase- (GSK-) 3 β were inactivated by combination treatment. In addition, it was demonstrated that a direct activation of SMAD signaling pathway by BMP4 stimulation has a similar antiproliferative effect, such as treatment with sildenafil or imatinib. This means, that decreased

activity of the SMAD signaling pathway is not only an aftereffect of PAH. The drug induced SMAD pathway activation also can affect the progression of this disease positively.

Studies in the animal model with Sprague-Dawley rats revealed that pulmonary vascular remodeling, which has been examined 5 weeks after a single monocrotaline (MCT) injection, could be prevented by oral administered sildenafil and imatinib from day 21 to day 35 after MCT injection. These positive changes were accompanied by increased expression of BMPR2 and SMAD1/5/8 in the pulmonary vascular walls of sildenafil or imatinib treated animals, wherein a combination treatment showed stronger effects than treatment with sildenafil or imatinib alone. Besides the vascular changes, the treated MCT rats showed significantly reduced right heart hypertrophy, reduced right ventricular systolic pressure and pulmonary vascular resistance index (PVRI) whereas systemic vascular resistance index (SVRI) was not noticeably affected. Furthermore, reduced cell proliferation was indicated by decreased cyclin D1 mRNA Expression, and less organ stress in heart was suggested by decreased B-type natriuretic peptide (BNP) expression.

These observations demonstrate that the SMAD signaling pathway plays a central role in the progression of PAH, which offers additional approaches for the treatment in the future. Although many questions still remain to be clarified, we could demonstrate that SMAD signaling pathway is positively influenced by the treatment with sildenafil and imatinib through diverse effects on the molecular and physiological levels.

8. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 2-1: Aufbau der menschlichen Lunge.** Die Trachea gabelt sich in die beiden Bronchien, die sich in den beiden Lungenflügeln immer weiter verzweigen (A) und über die Bronchiolen schließlich in die Alveolen münden. Jede Alveole ist mit einem Netz feiner Kapillaren umschlossen, so daß der Gasaustausch effizient stattfinden kann (B). (Verändert nach <http://www.uni-Duesseldorf.de/MathNat/Biologie/Didaktik/Atmung/start/struktur/ov/ovat/ovatmen.html> und Wort & Bild Verlag Konradshöhe GmbH & Co. KG, Simone Herzner / www.apotheken-umschau.de; 13.09.2005, aktualisiert am 04.09.2013.) 3
- Abbildung 2-2: Schematische Übersicht über den großen Blutkreislauf (unten) und den Lungenkreislauf (oben).** Gefäße mit sauerstoffreichem Blut sind in rot dargestellt, die mit sauerstoffarmen Blut in Blau. Vom rechten Vorhof gelangt das sauerstoffarme Blut in die Lungenarterie und schließlich zur Lunge, wo der Gasaustausch stattfindet. Von dort gelangt das O₂-angereicherte Blut über die Lungenvene und den linken Vorhof in die linke Herzkammer, die es über die Aorta in den Körperkreislauf transportiert. Nachdem das Blut in zahlreichen Kapillaren seinen Sauerstoff abgegeben hat, wird es in Venen gesammelt und gelangt schließlich über die Obere und untere Hohlvene zurück in den rechten Vorhof (Quelle: Onmeda.de, Dr. med. Fabian Weiland, Stand 15.8.2012) 5
- Abbildung 2-3: Aufbau der Arterienwand.** Endothel, Basalmembran *Membrana/Lamina elastica interna* bilden die *Tunica intima*, Arterielle glatte Muskelzellen und die *Membrana/Lamina elastica externa* bilden die *Tunica media*. Die *Tunica externa* besteht aus Bindegewebe mit kollagenen Fasern. (Fr. E. Joubert-Huebner, 25.03.2009, www.Kardiotechnik.org) 6
- Abbildung 2-4: Schema der pathologischen Abnormalitäten durch vaskuläres Remodeling während der pulmonalen Zirkulation.** Muskularisierung peripherer Arterien (i), Mediale Hypertrophie muskularisierter Arterien (ii), Verlust kleiner, präkapillärer Arterien (iii), Neointimaformierung mit Verlust der inneren lamina elastica interna (iv), Formierung plexiformer Läsionen (v). (Rabinovitch, M. 2008) (17) 10
- Abbildung 2-5: Verhältnisse zwischen den Mitgliedern der TGF- β Überfamilie.** BMP Family = Bone morphogenetic protein family, Dpp = Decapentaplecig (Drosophila Äquivalent zu BMP), Vg = vegetalising factor (Xenopus Homolog zu TGF- β), GDF = Growth differentiation factor, Vgr = Vg related gene, TGF- β = Transforming growth factor β , MIS = Myeloid inhibitory siglec, GDNF = Glial cell line-derived neurotrophic factor (Gilbert, Scott F., Developmental Biology, 8th Edition, August 2006, Sinauer Verlag, ISBN 0-87893-250-X) 17
- Abbildung 2-6: Schematisches Diagramm des Stickstoffmonoxid- (NO) und cyclischen Guanosinmonophosphat-Signalwegs.** NO wird aus L-Arginin durch die NO synthase (NOS) mit Hilfe

des Cofaktors tetrahydrobiopterin (BH4) synthetisiert. In vaskulären Muskelzellen interagiert NO mit der löslichen Guanylatcyclase (sGC) um Guanosintriphosphat (GTP) in zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) umzuwandeln. Dieses wird schließlich durch Phosphodiesterase 5 (PDE5) zu Guanosinmonophosphat (GMP) hydrolysiert und somit inaktiviert. Die Funktion besteht in der Regulation cGMP-vermittelter Ionenkanäle und PDEs, sowie der Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase (PKG). Die Aktivierung der PKG führt schließlich zur Regulation mehrerer nachgeschalteter Ziele, was schließlich eine Regulation der Zellkontraktion, Proliferation und des Zellüberlebens zur Folge hat. Desweiteren kann der cGMP-Spiegel auch durch andere Faktoren wie Natriuretische Peptide, die wiederum die partikuläre Guanylatcyclase (pGC) aktivieren, beeinflusst werden. (Verändert nach: Phosphodiesterase inhibitors for the treatment of pulmonary hypertension, M.R. Wilkins, J. Wharton, F. Grimminger and H.A.Ghofrani. Eur Respir J 2008; 32: 198–209.)..... 22

Abbildung 4-1: Der Effekt von Sildenafil, Imatinib, sowie deren Kombination auf die Proliferation von HPASMCs bei 5 % FCS-Stimulation (A) oder 30 ng/ml PDGF-Stimulation (B). Die letzten 4 h der 24-stündigen Stimulation wurden dem Medium 1,5 µCi ³[H]-Thymidin zugesetzt. Der ³[H]-Thymidingehalt der Zelllysate wurde durch Szintillationszählung bestimmt. Alle Werte wurden als Mittelwert in Prozent ± SEM angegeben (n=6). *P < 0,05 vs. FCS, [†]P < 0,05 vs. 0,5 µM Imatinib, [‡]P < 0,05 vs. PDGF..... 50

Abbildung 4-2: Auswirkungen von 8-Br-cGMP (A) oder 8-pCPT-cGMP (B) und Imatinib auf die Proliferationsrate von HPASMCs bei FCS-Stimulation. Die Zellen wurden für 20 h mit 5 % FCS stimuliert, die letzten 4 h der Stimulation wurden dem Medium 1.5 µCi ³[H]-Thymidin zugesetzt. Der ³[H]-Thymidingehalt der Zelllysate wurde durch Szintillationszählung bestimmt und in Zählungen/min (cpm) angegeben. Alle Werte wurden als Mittelwert ± SEM angegeben (n=6 (A), n=4 (B)). *P < 0,05 vs. FCS, [†]P < 0,05 vs. 0,5 µM Imatinib, [‡]P < 0,05 vs. PDGF..... 51

Abbildung 4-3: Einfluss von 8-Br-cGMP (A) bzw. 8-pCPT-cGMP (B) und Imatinib auf die Proliferationsrate von HPASMCs bei PDGF Stimulation (B). Stimuliert wurden die Zellen für 20 h mit 30 ng/ml PDGF, wobei die letzten 4 h der Stimulation dem Medium 1.5 µCi ³[H]-Thymidin zugesetzt wurde. Der ³[H]-Thymidingehalt der Zelllysate wurde durch Szintillationszählung bestimmt und als Mittelwert in Prozent ± SEM angegeben (n=5 (A), n=4 (B)). *P < 0,05 vs. FCS, [†]P < 0,05 vs. 0,5 µM Imatinib, [‡]P < 0,05 vs. PDGF. 52

Abbildung 4-4: Auswirkungen der Kombination von Sildenafil und Imatinib auf die Proteinexpression der Zellzyklusmarker Cyclin D1 (B), p21 (C) und p27 (D), angegeben als Mittelwert in Prozent ± SEM. Nach 24 h Inkubation unter serumfreien Bedingungen wurden PSMCs für 24 h mit Sildenafil (1 µM bzw. 10 µM) oder Imatinib (0,5 µM bzw. 5 µM) oder einer Kombination aus beiden (1 µM bzw. 10 µM Sildenafil und 0,5 µM Imatinib) stimuliert. Anschließend wurde mittels

Western Blot die relative Konzentration der Zellzyklusmarker bestimmt. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet. [†]P < 0,05 vs. 0,5 µM Imatinib, *P < 0,05 vs. 5 % FCS (n=6 {C}, n=5{B, D}) 54

Abbildung 4-5: Auswirkungen der Kombination von Sildenafil und Imatinib auf die Proteinphosphorylierung des SMAD1/5/8 Komplexes (B), des p-SMAD3 bzw. SMAD2/3 Komplexes (C), sowie den Proliferationsrelevanten Kinasen AKT (D), ERK (E) und GSK-3-β an den Phosphorylierungsstellen S9 (F) und Y216 (G) bei Stimulation mit 5 % FCS.

Nach 24 h Inkubation unter serumfreien Bedingungen wurden PSMCs für 30 min stimuliert und mit Sildenafil (1 µM oder 10 µM) oder Imatinib (0,5 µM, 5 µM) oder einer Kombination aus beiden (1 µM, bzw. 10 µM Sildenafil und 0,5 µM Imatinib) behandelt. Anschließend wurde mittels Western Blot die relative Proteinphosphorylierung von den oben genannten Mitgliedern des SMAD- bzw. TGF-β-Signalwegs und Kinasen analysiert. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet. [†]P < 0,05 vs. 0,5 µM Imatinib, *P < 0,05 vs. 5 % FCS (n=6 {B, D, E, F}, n=5{G}, n=4 {C}) 57

Abbildung 4-6: Auswirkungen der Kombination von Sildenafil und Imatinib auf die Proteinphosphorylierung des SMAD1/5/8 Komplexes (B), des p-SMAD3 bzw. SMAD2/3 Komplexes (C), sowie den Proliferationsrelevanten Kinasen AKT (D), ERK (E) und GSK-3-β S9 (F) und Y216 (G) bei Stimulation mit 30 ng/ml PDGF.

Nach 24 h Inkubation unter serumfreien Bedingungen wurden PSMCs für 30 min stimuliert und mit Sildenafil (1 µM oder 10 µM) oder Imatinib (0,5 µM, 5 µM) oder einer Kombination aus beiden (1 µM, bzw. 10 µM Sildenafil und 0,5 µM Imatinib) behandelt. Anschließend wurde mittels Western Blot die relative Proteinphosphorylierung von Mitgliedern des SMAD-Signalwegs und nachgeschalteten Proteinen analysiert. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet. Desweiteren wurde der Phosphorylierungsgrad der einzelnen Proteine graphisch in Relation gesetzt. [†]P < 0,05 vs. 0,5 µM Imatinib, [†]P < 0,05 vs. 30 ng/ml PDGF (n=7{B, C, E}, n=6 {D, G}, n=5 {F}) 59

Abbildung 4-7: Die Auswirkungen der Stimulation mit BMP4 auf die Zellproliferation in Relation zur Einzelbehandlung mit Sildenafil, Imatinib oder der Kombinationsbehandlung beider Substanzen.

Die letzten 4h der Stimulation wurden dem Medium 1.5 µCi ³[H]-Thymidin zugesetzt. Der ³[H]-Thymidingehalt der Zelllysate wurde durch Szintillationszählung bestimmt und in Zählungen/min (cpm) angegeben. Alle Werte wurden als Mittelwert ± SEM angegeben. [†]P < 0,05 vs. 0,5 µM Imatinib, [†]P < 0,05 vs. PDGF. (n=3) 60

Abbildung 4-8: Quantitative RT Real-Time PCR der Rezeptor-mRNAs für BMPR1a (A), BMPR1b (B), BMPR2 (C) und ACVR2a (D). Nach 24 h Inkubation unter Basalmedium erfolgte eine 24-stündige Stimulation mit 30 ng/ml PDGF, außerdem wurden die Zellen behandelt mit 1 µM bzw. 10 µM Sildenafil, und/oder 0,5 µM bzw. 5 µM Imatinib. Desweiteren wurde je eine Versuchsgruppe mit

30 ng/ml BMP4, sowie einer Kombination aus 30 g/ml BMP4, 10 µM Sildenafil und 0,5 µM Imatinib behandelt. Alle Ergebnisse wurden als $\Delta\Delta CT \pm SEM$ angegeben (n=6).....	62
Abbildung 4-9: Quantitative RT Real-Time PCR der R-SMAD-mRNAs für SMAD1 (A), SMAD5 (B), SMAD8 (C) und SMAD3 (D). Nach 24 h Inkubation unter Basalmedium erfolgte eine 24-stündige Stimulation mit 30 ng/ml PDGF, außerdem wurden die Zellen behandelt mit 1 µM bzw. 10 µM Sildenafil, und/oder 0,5 µM bzw. 5 µM Imatinib. Desweiteren wurde je eine Versuchsgruppe mit 30 ng/ml BMP4, sowie einer Kombination aus 30 g/ml BMP4, 10 µM Sildenafil und 0,5 µM Imatinib behandelt. Alle Ergebnisse wurden als $\Delta\Delta CT \pm SEM$ angegeben (n=6).....	63
Abbildung 4-10: Quantitative RT Real-Time PCR der mRNAs der SMAD1/5/8 Zielgene ID1 (A), ID2 (B) und ID3 (C). Nach 24 h Inkubation unter Basalmedium erfolgte eine 24-stündige Stimulation mit 30 ng/ml PDGF, außerdem wurden die Zellen behandelt mit 1 µM bzw. 10 µM Sildenafil, und/oder 0,5 µM bzw. 5 µM Imatinib. Desweiteren wurde je eine Versuchsgruppe mit 30 ng/ml BMP4, sowie einer Kombination aus 30 g/ml BMP4, 10 µM Sildenafil und 0,5 µM Imatinib behandelt. Alle Ergebnisse wurden als $\Delta\Delta CT \pm SEM$ angegeben (n=6). [†] P < 0,05 vs. 0,5µM Imatinib, [†] P < 0,05 vs. PDGF, [†] P < 0,05 vs. 30 ng/ml BMP4.....	64
Abbildung 4-11: Auswirkungen der Kombination von Sildenafil, sowie PKG Aktivatoren und Imatinib unter PDGF- und/oder BMP4 Stimulation auf die Zellmotilität von HPASMCs. Nach 24 h Inkubation unter Basalmedium erfolgte eine Stimulation mit 30 ng/ml PDGF (A, D, G), 30 ng/ml BMP4 (C, F, I) oder einer Kombination beider Liganden (B, E, H). Behandelt wurden die Zellen mit 1 µM bzw. 10 µM Sildenafil (A, B, C), 1 µM bzw. 10 µM 8-Br-cGMP (D, E, F), 50 ng/ml bzw. 200 ng/ml 8-pCPT-cGMP (G, H, I) und/oder 0,5 µM bzw. 5 µM Imatinib. Die Messdauer betrug 7 std, wobei die Werte PDGF- bzw. BMP4-stimulierter Proben als 100% definiert wurden. Alle Ergebnisse wurden als Mean \pm SEM angegeben (n=5 {C, F, I}, n=6 {A, B, D, E, G, H}). [†] P < 0,05 vs. 0,5µM Imatinib, [†] P < 0,05 vs. PDGF.	67
Abbildung 4-12: Effekt von Imatinib und/oder Sildenafil auf den rechtsventrikulären systolischen Druck (right ventricular systolic pressure, RVSP, mmHg) (A), Massenverhältnis der rechten Herzhälfte zu linker Herzhälfte plus Septum (right heart hypertrophy, RV/{LV+S}) (B), pulmonalvaskulärer Widerstandsindex (pulmonary vascular resistance index, PVRI, mmHg*min/(ml*100 g Körpermasse)) (C) und systemischer, vaskulärer Widerstandsindex (systemic vascular resistance index, SVRI mmHg*min/ml*100 g Körpermasse)) (D). Sildenafil (50 mg/kg/d) und Imatinib (50 mg/kg/d) wurden oral von Tag 21 bis Tag 35 verabreicht. Alle Werte wurden als Mittelwert \pm SEM angegeben (n=12). [†] P < 0,05 vs. 0,5 µM Imatinib, [#] P < 0,05 vs. MCT.	70
Abbildung 4-13: Effekt der Kombination von Sildenafil und Imatinib auf die RNA-Expression im rechten Ventrikel des Rattenherzens. Sildenafil (50 mg/kg/d) und/oder Imatinib (50 mg/kg/d) wurden oral von Tag 21 bis Tag 35 verabreicht. Mit den aus rechtsventrikulären Homogenaten	

isolierten RNA-Proben wurde anschließend eine RT Real-Time PCR durchgeführt, um die relative Menge an Myosin heavy chain 6 mRNA (A) und Myosin Heavy Chain 7 mRNA (B), der mRNA des Zellzyklusmarkers Cyclin D1 (C) und der mRNA des atrialen (D) und des B-Typ Natriuretischen Peptids (E) zu untersuchen.). [#]P < 0,05 vs. MCT, [†]P < 0,05 vs. 50 mg/kg/d Imatinib (n=4)..... 72

Abbildung 4-14: Histologische Untersuchung der BMPR2-Expression kleinerer Blutgefäße in der Rattenlunge. Sildenafil (50 mg/kg/d) und Imatinib (50 mg/kg/d) wurden oral von Tag 21 bis Tag 35 nach MCT-Injektion verabreicht. Verglichen wurden gesunde Tiere (A) mit Individuen, die durch MCT-Injektion eine PAH entwickelten (B), sowie Tieren, die mit Sildenafil (C), Imatinib (D) oder einer Kombination aus beiden Medikamenten (E) behandelt wurden. (n=4) 74

Abbildung 4-15: Histologische Untersuchung der p-SMAD1/5/8-Expression kleinerer Blutgefäße in der Rattenlunge. Sildenafil (50 mg/kg/d) und Imatinib (50 mg/kg/d) wurden oral von Tag 21 bis Tag 35 nach MCT-Injektion verabreicht. Verglichen wurden gesunde Tiere (A) mit Individuen, die durch MCT-Injektion eine PAH entwickelten (B), sowie Tiere, die mit Sildenafil (C), Imatinib (D) oder einer Kombination aus beiden Medikamenten (E) behandelt wurden. (n=4) 75

Abbildung 5-1: Graphische Zusammenfassung der Auswirkungen einer Sildenafilbehandlung auf humane SMCs, sowie den Organismus im MCT-Rattenmodell. PDE5: Phosphodiesterase 5, cGMP: cyclisches Guanosinmonophosphat; PKG: Proteinkinase G, Cyclin D1: Proteinkonzentration von Cyclin D1, Myh6/Myh7: schwere α -/ β -Kette Myosin-mRNA, ANP: atriale Natriuretische Peptid mRNA im Rattenherz, BNP: "brain" Natriuretische Peptid-mRNA im Rattenherz, RVSP: Rechtsventrikulärer systolischer Druck, RV/(LV+S): Masse des rechten Ventrikels in Relation zu Masse von linkem Ventrikel plus Septum, PA: Pulmonalarterien, BMPR2: „Bone morphogenetic Receptor“ 2, SMAD: „Small body size protein“/„Mothers against decapentaplegic“, ↓: verringerte Konzentration/verminderte Aktivität, ↑: erhöhte Konzentration/gesteigerte Aktivität. 83

Abbildung 5-2: Graphische Zusammenfassung der Auswirkungen einer Imatinibbehandlung auf humane PSMCs, sowie den Organismus im Rattenmodell. Myh6/Myh7: schwere α -/ β -Kette Myosin-mRNA im Rattenherz, ANP: Atriale Natriuretische Peptid mRNA im Rattenherz, BNP: B-Typ Natriuretische Peptid-mRNA im Rattenherz, AKT: Proteinkinase B-Aktivität, GSK-3 β : Glykogen Synthase Kinase 3 β -Aktivität, PDGFR: "Platelet derived Growth Factor" Rezeptor, ERK: "Extracellular Regulated Kinase"-Aktivität, PA: Pulmonalarterien, BMPR2: „Bone morphogenetic Receptor“ 2, SMAD: „Small body size protein“/„Mothers against decapentaplegic“, ↓: verringerte Konzentration/verminderte Aktivität, ↑: erhöhte Konzentration/gesteigerte Aktivität. 87

Abbildung 5-3: Graphische Zusammenfassung der Auswirkungen einer Kombinationsbehandlung mit Sildenafil und Imatinib auf SMCs, sowie den Organismus. PDE5: Phosphodiesterase 5, cGMP: cyclisches Guanosinmonophosphatkonzentration, PKG: Proteinkinase G-Aktivität, Cyclin D1: Proteinkonzentration von Cyclin D1, Myh6/Myh7: schwere α -/ β -Kette Myosin-mRNA im Rattenherz,

ANP: Atriale Natriuretische Peptid mRNA im Rattenherz, BNP: "brain" Natriuretische Peptid-mRNA im Rattenherz, RVSP: Rechtsventrikulärer systolischer Druck, RV/(LV+S): Masse des rechten Ventrikels in Relation zu Masse von linkem Ventrikel plus Septum, AKT: Proteinkinase B-Aktivität, GSK-3 β : Glycogen Synthase Kinase 3 β -Aktivität, PDGFR: Platelet derived Growth Factor Receptor; ERK: "Extracellular Regulated Kinase"-Aktivität; PA: Pulmonalarterien, BMPR2: „Bone morphogenetic Receptor“ 2, SMAD: „Small body size protein“/„Mothers against decapentaplegic“, ID3: „Inhibitor of DNA binding Protein“ 3, ↓: verringerte Konzentration/verminderte Aktivität, ↑: erhöhte Konzentration/gesteigerte Aktivität..... 93

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1: Übersicht der verwendeten Medien und Lösungen für das Anziehen und Splitten von pulmonal-arteriellen glatten Muskelzellen.	27
Tabelle 3-2: Auflistung der zur Zellstimulation verwendeten Wachstumsfaktoren, Inhibitoren und Substratanaloga.....	28
Tabelle 3-3: Übersicht der für den Western Blot verwendeten Chemikalien.....	29
Tabelle 3-4: Zusammensetzung des zur Proteinisolation verwendeten RIPA-Lysis-Puffers (Santa Cruz, Katalog-Nr. sc-24948A).....	29
Tabelle 3-5: Zusammensetzung des zur Gelelektrophorese verwendeten Acrylamid-Gels. Verwendet wurde ein 2-Phasengel bestehend aus Trenngel (10 %) und Sammelgel (6 %).	30
Tabelle 3-6: Zusammensetzung des für die Gelelektrophorese verwendeten Laufpuffers.....	30
Tabelle 3-7: Zusammensetzung des für die Gelelektrophorese verwendeten 5-fach SDS-Probenpuffers.....	30
Tabelle 3-8: Zusammensetzung des verwendeten Blot-Puffers	30
Tabelle 3-9: Zusammensetzung der beiden verwendeten Stripping-Puffer	31
Tabelle 3-10: Zusammensetzung der Waschlösung 20-fach TBS (TRIS-gepufferte Salzlösung).....	31
Tabelle 3-11: Übersicht der verwendeten Chemikalien für die RNA-Isolation, cDNA-Synthese und Real-Time PCR	32
Tabelle 3-12: Komponenten und Konzentrationen für die cDNA Synthese.....	32
Tabelle 3-13: Übersicht über die Komponenten der verwendeten PCR SYBR Green Kits	32
Tabelle 3-14: Übersicht der für den Proliferationsassay verwendeten Puffer und Lösungen.....	33
Tabelle 3-15: Auflistung der für die Histologie verwendeten Chemikalien und Lösungen.....	33
Tabelle 3-16: Auflistung genereller Verbrauchsmaterialien	34
Tabelle 3-17: Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien während der Gelelektrophorese, des Blottings, der Antikörperhybridisierung und der Entwicklung des Röntgenfilms.	35
Tabelle 3-18: Auflistung der bei der RNA-Isolation, cDNA-Synthese und RT-PCR verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	36
Tabelle 3-19: Auflistung der für den Proliferationsassay verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	36
Tabelle 3-20: Übersicht über die für Western Blot verwendeten Antikörper und ihrer Verdünnungen	37
Tabelle 3-21: über die für die Histologischen Färbungen verwendeten Antikörper und ihrer Verdünnungen.....	37
Tabelle 3-22: Übersicht der in der RT-PCR verwendeten Primer für mRNA aus humanen PASMC (Hu) und Rattengewebe (R), sowie deren Produktlänge und Hybridisierungstemperatur (T_h).....	38

10. Literaturverzeichnis

1. **Wehner, R. Gehring, W.** *Zoologie*. s.l. : Thieme Verlag, 23. Auflage. 3-13-367423-4.
2. **Campbell, N. A.** *Biologie*. s.l. : Spektrum Akademischer Verlag, 2. korrigierter Nachdruck 2000. 3-8274-0032-5.
3. **Renz-Polster, H., Krautzig, S., Braun, J.** *Basislehrbuch Innere Medizin*. s.l. : Urban und Fischer, 3. Auflage. 978-3-437-44460-9.
4. **Tortora, G. J., Derrickson, B. H.** *Anatomie und Physiologie*. s.l. : Wiley-Blackwell-Verlag, 2008. 978-3-527-32510-8.
5. **Romberg, E.** Ueber Sklerose der Lungen Arterie. *Dtsch Archiv Klin Med.* 48:197-206, 1891.
6. **Hoeper, M.M., Ghofrani, H.A., Gorenflo, M., Grünig, E., Rosenkranz, S.** Diagnostik und Therapie der pulmonalen Hypertonie - Europäische Leitlinien 2009. *Kardiologe* 4189-207. 2010, online publiziert 20. Mai 2010, 4, 189-207.
7. **Gerald Simonneau, Michael A. Gatzoulis, Ian Adatia, David Celermajer, Chris Denton, Ardeschir Ghofrani, Miguel Angel Gomez Sanchez, R. Krishna Kumar, Michael Landzberg, Roberto F. Machado, Horst Olschewski, Ivan M. Robbins, Rogiero Souza.** Updated Clinical Classification of Pulmonary Hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013, Vol. 62, No. 25, Suppl D.
8. **Hoendermis, E. S.** Pulmonary arterial hypertension: an update. *Neth Heart J.* 2011, 19:514 – 522.
9. **Bogaard HJ, Abe K, Vonk NA, Voelkel NF.** The right ventricle under pressure: cellular and molecular mechanisms of right-heart failure in pulmonary hypertension. *Chest* . 2009 , March;135(3):794-804.
10. **Tasleem Raza, Muhammad Dilawar.** Pulmonary Hypertension: A comprehensive Review. *Heart Views*. 2007, Volume 8 No 3. Sept-Nov; 90-99.
11. **Simonneau G, Galie N, Rubin LJ, Langleben D, Seeger W, Domenighetti G, Gibbs S, Lebrec D, Speich R, Beghetti M, Rich S, Fishman A.** Clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2004 , June 16;43(12 Suppl S):5S-12S.
12. **Ingo Krakau, Harald Lapp.** *Das Herzkatheterbuch - Diagnostische und interventionelle Kathetertechniken*, 2. Auflage. Stuttgart : Thieme, 2009. ISBN-10: 3131124121.

13. **MJ., Mulvany.** Small artery remodeling and significance in the development of hypertension. *News Physiol Sci* . 2002 , June;17:105-9.
14. **Mulvany, MJ.** Small artery remodeling in hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 2002, February;4(1):49-55.
15. **E., Dony.** Therapeutischer Effekt des Protein-Tyrosinkinasehemmers Imatinib (STI 571) im Modell der Monocrotalin-induzierten pulmonalen Hypertonie der Ratte. *JLU Giessen.* 2006.
16. **U., Rubin.** Primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med* . 1997 , January 9;336(2):111-7.
17. **Rabinovitch, Marlene.** Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *The Journal of Clinical Investigation* . 2008, Volume 118 Number 7 July.
18. **Giuseppe G. Pietra, MD, Frederique Capron, MD, Susan Stewart, MD, Ornella Leone, MD, Marc Humbert, MD, Ivan M. Robbins, MD, Lynne M. Reid, MD, R.M. Tuder, MD.** Pathologic assessment of vasculopathies in pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology.* 2004, Volume 43, Issue 12, Supplement, 16 June 2004, Pages S25–S32.
19. **Rubin M. Tuder, M.D., John C. Marecki, Ph.D., Amy Richter, B.S.,d Iwona Fijalkowska, Ph.D. and Sonia Flores, Ph.D.** Pathology of Pulmonary Hypertension. *Clin Chest Med.* 2007, March; 28(1): 23–vii. .
20. **Katherine Howell, Robert J. Preston and Paul McLoughlin.** Chronic hypoxia causes angiogenesis in addition to remodelling in the adult rat pulmonary circulation. *J Physiol.* 2003, 547.1, pp. 133–145.
21. **Ralph T. Schermuly, Klaus P. Kreisselmeier, Hossein A. Ghofrani, Hüseyin Yilmaz, Ghazwan Butrous, Leander Ermert, Monika Ermert, Norbert Weissmann, Frank Rose, Andreas Guenther, Dieter Walmrath, Werner Seeger, and Friedrich Grimminger.** Chronic sildenafil treatment inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* 2004, 169(1):39 – 45.
22. **Hassoun PM, Mouthon L, Barberà JA, Eddahibi S, Flores SC, Grimminger F, Jones PL, Maitland ML, Michelakis ED, Morrell NW, Newman JH, Rabinovitch M, Schermuly R, Stenmark KR, Voelkel NF, Yuan JX, Humbert M.** Inflammation, growth factors, and pulmonary vascular remodeling. *J Am Coll Cardiol.* 2009, Jun 30;54(1 Suppl):S10-9. doi: 10.1016/j.jacc.2009.04.006.
23. **Cool CD, Kennedy D, Voelkel NF, Tuder RM.** Pathogenesis and evolution of plexiform lesions in pulmonary hypertension associated with scleroderma and human immunodeficiency virus infection. *Hum Pathol.* 1997, Apr;28(4):434-42.

24. **Morse, Jane.** Defining the Role and Clinical Relevance of BMPR2 Mutations In Pulmonary Arterial Hypertension. *Pulmonary Hypertension Association (Online University)*. 2005, Vol 4, No 1 (Spring 2005).
25. **Perros F, Montani D, Dorfmüller P, Durand-Gasselin I, Tcherakian C, Le Pavec J, Mazmanian M, Fadel E, Mussot S, Mercier O, Hervé P, Emilie D, Eddahibi S, Simonneau G, Souza R, Humbert M.** Platelet-derived growth factor expression and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008, Jul 1;178(1):81-8. doi: 10.1164/rccm.200707-1037OC. Epub 2008 Apr 17.
26. **Saadia Eddahibi, Christophe Guignabert, Anne-Marie Barlier-Mur, Laurence Dewachter, Elie Fadel, Philippe Dartevelle, Marc Humbert, Gerald Simonneau, Naïma Hanoun, Françoise Saurini, Michel Hamon, Serge Adnot.** Cross Talk Between Endothelial and Smooth Muscle Cells in Pulmonary Hypertension; Critical Role for Serotonin-Induced Smooth Muscle Hyperplasia. *Circulation*. 2006, 113: 1857-1864.
27. **Lambers C, Roth M, Zhong J, Campregher C, Binder P, Burian B, Petkov V, Block LH.** The Interaction of Endothelin-1 and TGF- β 1 Mediates Vascular Cell Remodeling. *PLoS One*. 2013, Aug 28;8(8):e73399.
28. **Le Cras TD, Hardie WD, Fagan K, Whitsett JA, Korfhagen TR.** Disrupted pulmonary vascular development and pulmonary hypertension in transgenic mice overexpressing transforming growth factor- α . *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003, Nov;285(5):L1046-54. Epub 2003 Aug 1.
29. **Geiger R, Berger RM, Hess J, Bogers AJ, Sharma HS, Mooi WJ.** Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in pulmonary plexogenic arteriopathy due to congenital heart disease. *J Pathol*. 2000, Jun;191(2):202-7.
30. **Christman BW, McPherson CD, Newman JH, King GA, Bernard GR, Groves BM, Loyd JE.** An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med*. 1992, Jul 9;327(2):70-5.
31. **Launay JM, Hervé P, Peoc'h K, Tournois C, Callebort J, Nebigil CG, Etienne N, Drouet L, Humbert M, Simonneau G, Maroteaux L.** Function of the serotonin 5-hydroxytryptamine 2B receptor in pulmonary hypertension. *Nat Med*. 2002, Oct;8(10):1129-35. Epub 2002 Sep 16.
32. **Wilkins MR, Wharton J, Grimminger F, Ghofrani HA.** Phosphodiesterase inhibitors for the treatment of pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 2008, 32:198–209.

33. **O'Callaghan DS, et al.** Treatment of pulmonary arterial hypertension with targeted therapies. *Nat Rev Cardiol* . 2011, 8(9):526 – 38.
34. **S. S. Pullamsetti, R. Savai, W. Janssen, B. K. Dahal, W. Seeger, F. Grimminger, H. A. Ghofrani, N. Weissmann and R. T. Schermuly.** Inflammation, immunological reaction and role of infection in pulmonary hypertension. *Clinical Microbiology and Infection*. 2010, Volume 17, Issue 1, Article first published online: 8 JUN.
35. **Graham BB, Bandeira AP, Morrell NW, Butrous G, Tudor RM.** Schistosomiasis-associated pulmonary hypertension: pulmonary vascular disease: the global perspective. *Chest*. 2010 , Jun;137(6 Suppl):20S-29S. doi: 10.1378/chest.10-0048.
36. **David Montani, Sven Günther, Peter Dorfmüller, Frédéric Perros, Barbara Girerd, Gilles Garcia, Xavier Jaïs, Laurent Savale, Elise Artaud-Macari, Laura C Price, Marc Humbert, Gérald Simonneau and Olivier Sitbon.** Pulmonary arterial hypertension. *Journal of Rare Diseases* . 2013, 8:97.
37. **Moncada S, et al.** An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* . 1976, 263(5579):663 – 5.
38. **Rubin LJ, et al.** Treatment of primary pulmonary hypertension with continuous intravenous prostacyclin (epoprostenol). Results of a randomized trial. *Ann Intern Med* . 1990, 112(7):485 – 91.
39. **Higenbottam T, et al.** Long-term treatment of primary pulmonary hypertension with continuous intravenous epoprostenol (prostacyclin). *Lancet* . 1984 , 1(8385):1046 – 7.
40. **Giaid A, et al.** Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med*. 1993, 328(24):1732 – 9.
41. **Channick RN, et al.** Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomised placebo-controlled study. *Lancet* . 2001, 358(9288):1119 – 23.
42. **Galiè N, Corris PA, Frost A, Girgis RE, Granton J, Jing ZC, Klepetko W, McGoon MD, McLaughlin VV, Preston IR, Rubin LJ, Sandoval J, Seeger W, Keogh A.** Updated Treatment Algorithm of Pulmonary Arterial Hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2013, Dec 24;62(25 Suppl):D60-72. doi: 10.1016/j.jacc.2013.10.031.
43. **Galiè N, Badesch D, Oudiz R, Simonneau G, McGoon MD, Keogh AM, Frost AE, Zwicke D, Naeije R, Shapiro S, Olschewski H, Rubin LJ.** Ambrisentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2005, Aug 2;46(3):529-35.

44. **Galiè N, Olschewski H, Oudiz RJ, Torres F, Frost A, Ghofrani HA, Badesch DB, McGoon MD, McLaughlin VV, Roecker EB, Gerber MJ, Dufton C, Wiens BL, Rubin LJ.** Ambrisentan for the treatment of pulmonary arterial hypertension: results of the ambrisentan in pulmonary arterial hypertension, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter, efficacy (ARIES) study 1 and 2. *Circulation*. 2008, Jun 10;117(23):3010-9. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.742510. Epub 2008 May 27.
45. **O'Callaghan DS, et al.** Treatment of pulmonary arterial hypertension with targeted therapies. *Nat Rev Cardiol*. 2011, 8(9):526 – 38.
46. **Ghofrani HA, et al.** Sildenafil for treatment of lung fibrosis and pulmonary hypertension: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2002, 360(9337):895 – 900.
47. **Giaid A, Saleh D.** Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med*. 1995, Jul 27;333(4):214-21.
48. **Ghofrani HA, Galiè N, Grimminger F, Grünig E, Humbert M, Jing ZC, Keogh AM, Langleben D, Kilama MO, Fritsch A, Neuser D, Rubin LJ.** Riociguat for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*. 2013, Jul 25;369(4):330-40.
49. **Nazzareno Galie, MD, PhD, Dieter Neuser, MD, PhD, Katharina Muller, Dipl. Stat, Andrea-Viviana Scalise, MD, Ekkehard Grunig, MD.** A Placebo-Controlled, Double-Blind Phase II Interaction Study To Evaluate Blood Pressure Following Addition Of Riociguat To Patients With Symptomatic Pulmonary Arterial Hypertension (PAH) Receiving Sildenafil (PATENT PLUS). *B98. CLINICAL TRIALS IN PULMONARY HYPERTENSION*. 2013, A3530.
50. **Rajendrakumar Patel, Wilbert S. Aronow, Laxeshkumar Patel, Kaushang Gandhi, Harit Desai, Dhiraj Kaul, Sumir P. Sahgal.** Treatment of pulmonary hypertension. *Med Sci Monit*. 2012, 18(4): RA31-39.
51. **Simonneau G, et al.** Addition of sildenafil to long-term intravenous epoprostenol therapy in patients with pulmonary arterial hypertension: a randomized trial. *Ann Intern Med*. 2008, 149(8):521 – 30.
52. **Iglarz M, et al.** Pharmacology of macitentan, an orally active tissue-targeting dual endothelin receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008, 327(3):736 – 45.
53. **Morrison K, et al.** Differential effects of selexipag and prostacyclin analogs in rat pulmonary artery. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012, 343(3):547 – 55.

54. **Asaki T, et al.** Structure-activity studies on diphenylpyrazine derivatives: a novel class of prostacyclin receptor agonists. *Bioorg Med Chem.* 2007, 15(21):6692 – 704.
55. **Kuwano K, et al.** 2-[4-[(5,6-diphenylpyrazin-2-yl)(isopropyl)amino]butoxy]-N-(methylsulfonyl)acetamide (NS-304), an orally available and long-acting prostacyclin receptor agonist prodrug. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007, 322(3):1181 – 8.
56. **Ghofrani HA, Grimminger F.** Soluble guanylate cyclase stimulation: an emerging option in pulmonary hypertension therapy. *Eur Respir Rev.* 2009, 18(111):35 – 41.
57. **RJ, Barst.** PDGF signaling in pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest.* 2005, 115(10):2691 – 4.
58. **Panos RJ, Baker SK.** Mediators, cytokines, and growth factors in liver-lung interactions. *Clin Chest Med.* 1996, 17(1):151 – 69.
59. **Cohen, M.H., et al.** . Approval summary for imatinib mesylate capsules in the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Clin. Cancer Res.* 2002, 8:935–942.
60. **Schermuly, R.T., Dony, E., Ghofrani, H.A., Pullamsetti, S., Savai, R., Roth, M., Sydykov, A., Lai, Y.J., Weissmann, N., Seeger, W., et al.** Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J Clin Invest.* 2005, 115(10):2811 – 21.
61. **Ghofrani H, et al.** Imatinib in pulmonary arterial hypertension patients with inadequate response to established therapy. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010, 182(9):1171 – 7.
62. **Hoeper MM, et al.** Imatinib mesylate as add-on therapy for pulmonary arterial hypertension: results of the randomized IMPRES study. *Circulation* . 2013, 127(10):1128 – 38.
63. Normal - Vascular Smooth Muscle Cells. *www.lonza.com*. [Online] Lonza Group. [Zitat vom: 03. 12 2013.] <http://www.lonza.com/products-services/bio-research/primary-and-stem-cells/human-cells-and-media/smooth-muscle-cells-and-media/human-vascular-smooth-muscle-cells.aspx>.
64. **Cowan KN, Heilbut A, Humpl T, Lam C, Ito S, Rabinovitch M.** Complete reversal of fatal pulmonary hypertension in rats by a serine elastase inhibitor. *Nat Med.* 2000, June;6(6):698-702.
65. **Veit, Florian.** Regulation und Funktion der NADPH-Oxidase 1 in pulmonalvaskulären glatten Muskelzellen aus Ratten im Modell der Monocrotalin-induzierten pulmonalen Hypertonie. *Justus-Liebig-Universität Gießen.* 2012.
66. **Marsboom GR, Janssens SP.** Models for pulmonary hypertension. *Drug Discovery Today: Disease Models* . 2004, 1(3):289-95.

67. Environmental Health Criteria 80: Pyrrolizidine Alkaloids . *WHO*. 1988.
68. **Campbell AI, Kuliszewski MA, Stewart DJ**. Cell-based gene transfer to the pulmonary vasculature: Endothelial nitric oxide synthase overexpression inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1999, November;21(5):567-75.
69. **Sugita T, Hyers TM, Dauber IM, Wagner WW, McMurtry IF, Reeves JT**. Lung vessel leak precedes right ventricular hypertrophy in monocrotaline-treated rats. *J Appl Physiol* . 1983, February;54(2):371-4.
70. **Valdivia E, Lalich JJ, Hayashi Y, Sonnad J**. Alterations in pulmonary alveoli after a single injection of monocrotaline. *Arch Pathol* . 1967 , July;84(1):64-76.
71. **Wilson DW, Segall HJ, Pan LC, Dunston SK**. Progressive inflammatory and structural changes in the pulmonary vasculature of monocrotaline-treated rats. *Microvasc Res* . 1989, July;38(1):57-80.
72. **Schultze AE, Roth RA**. Chronic pulmonary hypertension--the monocrotaline model and involvement of the hemostatic system. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 1998, October;1(4):271-346.
73. **Roth RA, Ganey PE**. Platelets and the puzzles of pulmonary pyrrolizidine poisoning. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1988, May;93(3):463-71.
74. **Lalich JL, Johnson WD, Raczniak TJ, Shumaker RC**. Fibrin thrombosis in monocrotaline pyrrole-induced cor pulmonale in rats. *Arch Pathol Lab Med*. 1977, February;101(2):69-73.
75. **Allen JR, Carstens LA**. Pulmonary vascular occlusions initiated by endothelial lysis in monocrotaline-intoxicated rats. *Exp Mol Pathol*. 1970 , October;13(2):159-71.
76. **Meyrick B, Gamble W, Reid L**. Development of Crotalaria pulmonary hypertension: hemodynamic and structural study. *Am J Physiol*. 1980, November;239(5):H692-H702.
77. **Todorovich-Hunter L, Johnson DJ, Ranger P, Keeley FW, Rabinovitch M**. Altered elastin and collagen synthesis associated with progressive pulmonary hypertension induced by monocrotaline. A biochemical and ultrastructural study. *Lab Invest*. 1988, February;58(2):184-95.
78. **Todorovich-Hunter L, Dodo H, Ye C, McCreedy L, Keeley FW, Rabinovitch M**. Increased pulmonary artery elastolytic activity in adult rats with monocrotaline-induced progressive hypertensive pulmonary vascular disease compared with infant rats with nonprogressive disease. *Am Rev Respir Dis*. 1992, July;146(1):213-.

79. **C.N.Gillis, Ryan J. Huxtable, Robert A. Roth.** Effects of Monocrotaline pretreatment of rats on removal of 5-Hydroxytryptamine and Noradrenaline by perfused Lung. *Br. J. Pharmac.* 1978, 63, 435-443.
80. **Hayashi Y, Lalich JJ.** Renal and pulmonary alterations induced in rats by a single injection of monocrotaline. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1967, 124(2):392-396 .
81. **Gilbert, Scott F.** *Developmental Biology.* s.l. : Sinauer, 8th Edition, August 2006. ISBN 0-87893-250-X.
82. **Rebbapragada A, Benchabane H, Wrana JL, Celeste AJ, Attisano L.** Myostatin signals through a transforming growth factor beta-like signaling pathway to block adipogenesis. *Mol Cell Biol.* 2003, 23:7230–7242. [PubMed: 14517293].
83. **Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA.** Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science.* 1988, 242:1528–1534.
84. **Kishigami S, Mishina Y.** BMP Signaling in early embryonic patterning. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005, 16:265-278 [PubMed: 15871922].
85. **GQ, Zhao.** Consequences of knocking out BMP signaling in the mouse. *Genesis.* 2003, 35:43-56 [PubMed: 12481298].
86. **Gamer LW, Nove J, Levin M, Rosen V.** BMP-3 is a novel inhibitor of both activin and BMP-4 signaling in *Xenopus* embryos. *Dev Biol.* 2005, 285:156–168. [PubMed: 16054124].
87. **Wiater E, Vale W.** Inhibin is an antagonist of bone morphogenetic protein signaling. *J Biol Chem.* 2003, 278:7934–7941. [PubMed: 12493742].
88. **Umulis D, O'Connor MB, Blair SS.** The extracellular regulation of bone morphogenetic protein signaling. *Development.* 2009, 136:3715–3728. [PubMed: 19855014].
89. **Seemann P, Brehm A, König J, Reissner C, Stricker S, Kuss P, Haupt J, Renninger S, Nickel J, Sebald W, Groppe JC, Ploger F, Pohl J, Schmidt-von Kegler M, Walther M, Gassner I, Rusu C, Janecke AR, Dathe K, Mundlos S.** Mutations in GDF5 reveal a key residue mediating BMP inhibition by Noggin. *PLoS Genet.* 2009, 5(11):e1000747. [PubMed: 19956691].
90. **Zimmerman LB, De Jesus-Escobar JM, Harland RM.** The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell.* 1996, 86:599–606. [PubMed: 8752214].

91. **Piccolo S, Sasai Y, Lu B, De Robertis EM.** Dorsoventral patterning in *Xenopus*: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. *Cell*. 1996, 86:589–598. [PubMed: 8752213].
92. **Miyazono K, Kamiya Y, Morikawa M.** Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem*. 2010, Jan; 147:35–51. [PubMed: 19762341].
93. **Moustakas A, Heldin CH.** The regulation of TGFbeta signal transduction. *Development*. 2009, 136:3699–3714. [PubMed: 19855013].
94. **Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Lebrin F, Larsson J, Mummery C, Karlsson S, ten Dijke P.** Activin receptor-like kinase (ALK)1 is an antagonistic mediator of lateral TGFbeta/ALK5 signaling. *Mol Cell*. 2003, 12:817–828. [PubMed: 14580334].
95. **Upton PD, Davies RJ, Tajsic T, Morrell NW.** TGFβ1 Represses BMP-Mediated Smad Signaling in Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells Via Smad3. *Am J Respir Cell Mol Biol*. . 2013, Aug 12. (Epub).
96. **A. Zakrzewicz, F.M. Kouri, B. Nejman, G. Kwapiszewska, M. Hecker, R. Sandu, E. Dony, W. Seeger, R.T. Schermuly, O. Eickelberg and R.E. Morty.** The transforming growth factor-beta/Smad2,3 signalling axis is impaired in experimental pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 2007, 29: 1094–110.
97. **Wrighton KH, Lin X, Yu PB, Feng XH.** Transforming Growth Factor {beta} Can Stimulate Smad1 Phosphorylation Independently of Bone Morphogenic Protein Receptors. *J Biol Chem*. . 2009, Apr 10;284(15):9755-63. doi: 10.1074/jbc.M809223200. Epub 2009 Feb 18.
98. **Chan MC, Nguyen PH, Davis BN, Ohoka N, Hayashi H, Du K, Lagna G, Hata A.** A novel regulatory mechanism of the bone morphogenetic protein (BMP) signaling pathway involving the carboxyl-terminal tail domain of BMP type II receptor. *Mol Cell Biol*. 2007, Aug;27(16):5776-89. Epub 2007 Jun 18.
99. **Nickel J, Sebald W, Groppe JC, Mueller TD.** Intricacies of BMP receptor assembly. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009, 20:367–377. [PubMed: 19926516].
100. **Mazerbourg S, Klein C, Roh J, Kaivo-Oja N, Mottershead DG, Korchynskyi O, Ritvos O, Hsueh AJ.** Growth differentiation factor-9 signaling is mediated by the type I receptor, activin receptor-like. *Mol Endocrinol*. 2004, 18:653–665. [PubMed: 14684852].
101. **Vitt UA, Mazerbourg S, Klein C, Hsueh AJ.** Bone morphogenetic protein receptor type II is a receptor for growth differentiation factor-9. *Biol Reprod*. 2002, 67:473–480. [PubMed: 12135884].

102. **de Caestecker, Jonathan W. Lowery and Mark P.** BMP SIGNALING IN VASCULAR DEVELOPMENT AND DISEASE. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010, August ; 21(4): 287–298. doi:10.1016/j.cytogfr.2010.06.001.
103. **Daly AC, Randall RA, Hill CS.** Transforming growth factor beta-induced Smad1/5 phosphorylation in epithelial cells is mediated by novel receptor complexes and is essential for anchorage-independent growth. *Mol Cell Biol.* 2008, 28:6889–6902. [PubMed: 18794361].
104. **Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P, ten Dijke P.** Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *Embo J.* 2002, 21:1743–1753. [PubMed: 11927558].
105. **Kirkbride KC, Ray BN, Blobe GC.** Cell-surface co-receptors: emerging roles in signaling and human disease. *Trends Biochem Sci.* 2005, 30:611–621. [PubMed: 16185874].
106. **Kirkbride KC, Townsend TA, Bruinsma MW, Barnett JV, Blobe GC.** Bone morphogenetic proteins signal through the transforming growth factor-beta type III receptor. *J Biol Chem.* 2008, 283:7628–7637. [PubMed: 18184661].
107. **Lewis KA, Gray PC, Blount AL, MacConell LA, Wiater E, Bilezikjian LM, Vale W.** Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. *Nature.* 2000, 404:411–414. [PubMed: 10746731].
108. **David L, Mallet C, Mazerbourg S, Feige JJ, Bailly S.** Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood.* 2007, 109:1953–1961. [PubMed: 17068149].
109. **Schnerer O, Meurer SK, Tihaa L, Gressner AM, Weiskirchen R.** Endoglin differentially modulates antagonistic transforming growth factor-beta1 and BMP-7 signaling. *J Biol Chem.* 2007, 282:13934–13943. [PubMed: 17376778].
110. **Ross S, Hill CS.** How the Smads regulate transcription. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008, 40:383–408. [PubMed: 18061509].
111. **Hayashi H, Abdollah S, Qiu Y, et al.** The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. *Cell.* 1997, 89:1165–1173.
112. **Nakao A, Afrakhte M, Morén A, et al.** Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature.* 1997, 389:631–635.

113. **Itoh S, ten Dijke P.** Negative regulation of TGF-beta receptor/Smad signal transduction. *Curr Opin Cell Biol.* 2007, 19:176–184.
114. **Le Roy C, Wrana JL.** Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005, 6:112–126.
115. **Izzi L, Attisano L.** Regulation of the TGFbeta signalling pathway by ubiquitin-mediated degradation. *Oncogene.* 2004, 23:2071–2078.
116. **Di Guglielmo GM, Le Roy C, Goodfellow AF, Wrana JL.** Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. *Nat Cell Biol.* 2003, 5:410–421.
117. **Murakami G, Watabe T, Takaoka K, Miyazono K, Imamura T.** Cooperative inhibition of bone morphogenetic protein signaling by Smurf1 and inhibitory Smads. *Mol Biol Cell.* 2003, 14:2809–2817.
118. **Ebisawa T, Fukuchi M, Murakami G, et al.** Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *J Biol Chem.* 2001, 276:12477–12480.
119. **Kavsak P, Rasmussen RK, Causing CG, et al.** Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Mol Cell.* 2000, 6:1365–1375.
120. **Wrighton KH, Lin X, Feng XH.** Phospho-control of TGF-beta superfamily signaling. *Cell Res.* 2009, 19:8–20. [PubMed: 19114991].
121. **Davis BN, Hilyard AC, Lagna G, Hata A.** SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature.* 2008, 454:56–61. [PubMed: 18548003].
122. **Kass DA, Takimoto E, Nagayama T, Champion HC.** Phosphodiesterase regulation of nitric oxide signaling. *Cardiovasc Res.* 2007, 75: 303–314.
123. **M.R. Wilkins, J. Wharton, F. Grimminger and H.A. Ghofrani.** Phosphodiesterase inhibitors for the treatment of pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 2008, 32: 198–209.
124. **Corbin JD, Beasley A, Blount MA, Francis SH.** High lung PDE5: a strong basis for treating pulmonary hypertension with PDE5 inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005, 334: 930–938.
125. **Wharton J, Strange JW, Møller GM, et al.** Antiproliferative effects of phosphodiesterase type 5 inhibition in human pulmonary artery cells. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005, 172: 105–113.
126. **JR., Klinger.** The nitric oxide/cGMP signaling pathway in pulmonary hypertension. *Clin Chest Med.* 2007, 28:143–67, ix.

127. **Fagan KA, Tyler RC, Sato K, et al.** Relative contributions of endothelial, inducible, and neuronal NOS to tone in the murine pulmonary circulation. *Am J Physiol.* 1999, 277:L472–L478.
128. **Schwappacher R, Weiske J, Heining E, Ezerski V, Marom B, Henis YI, Huber O, Knaus P.** Novel crosstalk to BMP signalling: cGMP-dependent kinase I modulates BMP receptor and Smad activity. *EMBO J.* 2009, 28:1537–1550.
129. **Jun Yang, Xiaohui Li, Rafia S. Al-Lamki, Changxin Wu, Astrid Weiss, Joachim Berk, Ralph T. Schermuly and Nicholas W. Morrell.** Sildenafil Potentiates Bone Morphogenetic Protein Signaling in Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells and in Experimental Pulmonary Hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013, 2013;33:34-42, originally published online November 8, 2012.
130. **Archer SL, Michelakis ED.** Phosphodiesterase type 5 inhibitors for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med.* 2009, 361:1864–1871.
131. **Yang J, Davies RJ, Southwood M, Long L, Yang X, Sobolewski A, Upton PD, Trembath RC, Morrell NW.** Mutations in bone morphogenetic protein type II receptor cause dysregulation of Id gene expression in pulmonary artery smooth muscle cells: implications for familial pulmonary arterial hypertension. *Circ Res.* 2008, May 23;102(10):1212-21.
132. **Long L, Crosby A, Yang X, Southwood M, Upton PD, Kim DK, Morrell NW.** Altered bone morphogenetic protein and transforming growth factor-beta signaling in rat models of pulmonary hypertension: potential for activin receptor-like kinase-5 inhibition in prevention and progression of disease. *Circulation.* 2009, 119:566–576.
133. **Heldin CH, Westermark B.** Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev.* 1999, Oct;79(4):1283-316.
134. **Bergsten E, Uutela M, Li X, Pietras K, Ostman A, Heldin CH, Alitalo K, Eriksson U.** PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF beta-receptor. *Nat Cell Biol.* . 2001, May;3(5):512-6.).
135. **Li X, Pontén A, Aase K, Karlsson L, Abramsson A, Uutela M, Bäckström G, Hellström M, Boström H, Li H, Soriano P, Betsholtz C, Heldin CH, Alitalo K, Ostman A, Eriksson U.** PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF alpha-receptor. *Nat Cell Biol.* 2000, May;2(5):302-9.
136. **Johanna Andrae, Radosa Gallini, and Christer Betsholtz.** Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *GENES & DEVELOPMENT.* 2008, 22:1276–1312.
137. **Xuri Li, Ulf Eriksson.** Novel PDGF family members: PDGF-C and PDGF-D. *Cytokine & Growth Factor Reviews* . 2003, Volume 14, Issue 2 , Pages 91-98, April .

138. **Hoch, R.V. and Soriano, P.** Roles of PDGF in animal development. *Development* . 2003, 130: 4769–4784.
139. **Betsholtz, C.** Insight into the physiological functions of PDGF through genetic studies in mice. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004, 15: 215–228.
140. **Kelly, J.D., Haldeman, B.A., Grant, F.J., Murray, M.J., Seifert, R.A., Bowen-Pope, D.F., Cooper, J.A., and Kazlauskas, A.** Platelet-derived growth factor (PDGF) stimulates PDGF receptor subunit dimerization and intersubunit transphosphorylation. *J. Biol. Chem.* 1991, 266: 8987–8992.
141. **Kazlauskas, A. and Cooper, J.A.** Autophosphorylation of the PDGF receptor in the kinase insert region regulates interactions with cell proteins. *Cell.* 1989, 58: 1121–1133.
142. **Diliberto, P.A., Gordon, G.W., Yu, C.L., Earp, H.S., and Herman, B.** Platelet-derived growth factor (PDGF) alpha receptor activation modulates the calcium mobilizing activity of the PDGF beta receptor in Balb/c3T3 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 1992, 267: 11888–11897.
143. **Fatatis, A. and Miller, R.J.** *J. Biol. Chem.* 1997, 272: 4351–4358.
144. **Donovan J, Shiwen X, Norman J, Abraham D.** Platelet-derived growth factor alpha and beta receptors have overlapping functional activities towards fibroblas. *Fibrogenesis & Tissue Repair.* 2013, 6:10.
145. **Carroll, M., Ohno-Jones, S., Tamura, S., Buchdunger, E., Zimmermann, J., Lydon, N.B., Gilliland, D.G., and Druker, B.J.** CGP 57148, a tyrosine kinase inhibitor, inhibits the growth of cells expressing BCR–ABL, TEL–ABL, and TEL–PDGFR fusion proteins. *Blood.* 1997, 90: 4947–4952.
146. **Druker, B.J., Talpaz, M., Resta, D.J., Peng, B., Buchdunger, E., Ford, J.M., Lydon, N.B., Kantarjian, H., Capdeville, R., Ohno-Jones, S., et al.** Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR–ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2001, 344: 1031–1037.
147. **Demetri, G.D., von Mehren, M., Blanke, C.D., Van den Abbeele, A.D., Eisenberg, B., Roberts, P.J., Heinrich, M.C., Tuveson, D.A., Singer, S., Janicek, M., et al.** Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N. Engl. J. Med.* 2002, 347: 472–480.
148. **Humbert, M., Monti, G., Fartoukh, M., Magnan, A., Brenot, F., Rain, B., Capron, F., Galanaud, P., Duroux, P., Simonneau, G., et al.** Platelet-derived growth factor expression in primary pulmonary hypertension: Comparison of HIV seropositive and HIV seronegative patients. *Eur. Respir. J.* 1998, 11:554–559.

149. **Balasubramaniam, V., Le Cras, T.D., Ivy, D.D., Grover, T.R., Kinsella, J.P., and Abman, S.H.** Role of platelet-derived growth factor in vascular remodeling during pulmonary hypertension in the ovine fetus. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2003, 284: L826–L833. doi: 10.1152/ajplung.00199.2002.
150. **Morrell NW, Yang X, Upton PD, Jourdan KB, Morgan N, Sheares KK et al.** Altered growth responses of pulmonary artery smooth muscle cells from patients with primary pulmonary hypertension to transforming growth factor-beta(1) and bone morphogenetic proteins. *Circulation.* 2001, 104: 790–795.
151. **Atkinson C, Stewart S, Upton PD, Machado R, Thomson JR, Trembath RC et al.** Primary pulmonary hypertension is associated with reduced pulmonary vascular expression of type II bone morphogenetic protein receptor. *Circulation.* 2002, 105: 1672–1678.
152. **Morty RE, Nejman B, Kwapiszewska G, Hecker M, Zakrzewicz A, Kouri FM et al.** Dysregulated bone morphogenetic protein signaling in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007, 27: 1072–1078.
153. **Baliga RS, MacAllister RJ, Hobbs AJ.** New perspectives for the treatment of pulmonary hypertension. *Br J Pharmacol.* 2011, May; 163(1): 125–140. .
154. **Sobolewski A, Rudarakanchana N, Upton PD, Yang J, Crilley TK, Trembath RC et al.** Failure of bone morphogenetic protein receptor trafficking in pulmonary arterial hypertension: potential for rescue. *Hum Mol Genet.* 2008, 17: 3180–3190.
155. **Simon Malenfant, Anne-Sophie Neyron, Roxane Paulin, François Potus, Jolyane Meloche, Steeve Provencher and Sébastien Bonnet.** Signal transduction in the development of pulmonary arterial hypertension . *Pulm Circ.* 2013, Apr-Jun; 3(2): 278–293. PMCID: PMC3757823.
156. **Peacock AJ, Murphy NF, McMurray JJ, Caballero L, Stewart S.** An epidemiological study of pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J.* 2007, 30:104–9.
157. **Humbert M, Sitbon O, Chaouat A, Bertocchi M, Habib G, Gressin V, et al.** Pulmonary arterial hypertension in France: Results from a national registry. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006, 173:1023–30.
158. **Rich S, et al.** Primary pulmonary hypertension. A national prospective study. *Ann Intern Med.* 1987, 107(2):216 – 23.
159. **D'Alonzo GE, et al.** Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. *Ann Intern Med.* 1991, 115(5):343 – 9.

160. **McLaughlin VV, Archer SL, Badesch DB, Barst RJ, Farber HW, Lindner JR et al.** ACCF/AHA 2009 expert consensus document on pulmonary hypertension a report of the American College of Cardiology Found. Task Force on Expert Consensus Documents and the American Heart Association developed in collaboration with the A. College of C.P.[...]. *J Am Coll Cardiol.* 2009, 53: 1573–1619.
161. —. ACCF/AHA 2009 expert consensus document on pulmonary hypertension a report of the American College of Cardiology Found. Task Force on Expert Consensus Documents and the American Heart Association developed in collaboration with the A. College of C.P.[...]. *Circulation.* 2009, 119: 2250–2294.
162. **Actelion Pharmaceuticals.** Wie kann PAH behandelt werden? . *Actelion.de.* [Online] Actelion Pharmaceuticals Deutschland GmbH, Geschäftsführer Michael Danzl, 8. August 2013. [Zitat vom: 12. Februar 2014.] <http://www1.actelion.de/de/patienten/pulmonale-arterielle-hypertonie/wie-kann-PAH-behandelt-werden.page>.
163. **JR, Klinger.** The nitric oxide/cGMP signaling pathway in pulmonary hypertension. *Clin Chest Med.* 2007, 28:143–67.
164. **Rabinovitch, Marlene.** Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *The Journal of Clinical Investigation* . 2012, Volume 122, Number 12, December 2012, 4306-4313.
165. **Koc, Dr. med. Fevzi.** Sildenafil (Revatio®) bei Lungenhochdruck (Pulmonale Hypertonie). *Medknowledge.de.* [Online] Medknowledge, 25. März 2006. [Zitat vom: 12. Februar 2014.] <http://www.medknowledge.de/neu/med/jahr/2006/I-2006-13-revatio.htm>.
166. **Davies RJ, Morrell NW.** Molecular mechanisms of pulmonary arterial hypertension: role of mutations in the bone morphogenetic protein type II receptor. *Chest.* 2008, Dec;134(6):1271-7. doi: 10.1378/chest.08-1341.
167. **Chazova I, Loyd JE, Zhdanov VS, Newman JH, Belenkov Y, Meyrick B.** Pulmonary artery adventitial changes and venous involvement in primary pulmonary hypertension. *Am J Pathol.* 1995, 146(2):389–397.
168. **RefSeq, Sep 2011.** PRKG1 protein kinase, cGMP-dependent, type I [Homo sapiens (human)], Gene ID: 5592. *PRKG1.* [Online] 1. 3 2014. [Zitat vom: 3. 3 2014.] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=retrieve&dopt=default&rn=1&list_uids=5592.
169. **Jackie D. Corbin, Dagfinn Ogreid, Jon P. Miller, Robert H. Suva, Bernd Jastorff, and Stein O. Dorskeland.** Studies of cGMP Analog Specificity and Function of the Two Intrsubunit Binding Sites of

cGMP-dependent Protein Kinase. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 1986, Vol. 261, No. 3, Issue of January 25, pp. 1208-1214.

170. Characterization of a Novel Isozyme of cGMP-dependent Protein Kinase from Bovine Aorta. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 1989, Vol. 264, No. 13, Issue of May 5, pp. 7734-7741.

171. **Merritt K. Taylor, Rehan Ahmed, Michael Begley and Michael D. Uhler.** Autoinhibition and Isoform-specific Dominant Negative Inhibition of the Type II cGMP-dependent Protein Kinase. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 2002, Vol. 277, No. 40, Issue of October 4, pp. 37242–37253.

172. **Wei, JY, Cohen, ED und Genieser, H-G, Bamstable, CJ.** Substituted cGMP Analogs can act as selective Agonists of the rod Photoreceptor cGMP-gated cation channel. *J. Mol. Neurosci.* 1998, 10, 53-65.

173. **Datasheet, Biolog.** 8- Bromoguanosine- 3', 5'- cyclic monophosphate (8-Br-cGMP), fluorescence grade. [<http://www.biolog.de/products/products-cat-no/eshop/product/B%20004/>] Cat. No.: B 004 CAS No.: [51116-01-9] : Biolog. Referenz: Rapoport et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6470 - 6474 (1982).

174. —. 8- (4- Chlorophenylthio)guanosine- 3', 5'- cyclic monophosphate (8-pCPT-cGMP), fluorescence grade. [http://www.biolog.de/no_cache/products/eshop/product/C_009/] Cat. No.: C 009 CAS No.: [51239-26-0] Bulk available : Biolog. Referenz: Geiger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 1031 - 1035 (1992).

175. **Umberto Galderisi, Francesco Paolo Jori and Antonio Giordano.** Cell cycle regulation and neural differentiation. In: *Oncogene*. 22, Nr. 33, August 2003, S. 5208–19. doi:10.1038/sj.onc.1206558 . PMID 12910258. *Oncogene*. 2003, 22, 5208–5219. doi:10.1038/sj.onc.1206558.

176. **Lin Wei, Yinglin Liu, Hideaki Kaneto, and Barry L. Fanburg.** JNK regulates serotonin-mediated proliferation and migration of pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2010, Jun; 298(6): L863–L869. .

177. **Abhik Saha, Sabyasachi Halder, Santosh K. Upadhyay, Jie Lu, Pankaj Kumar, Masanao Murakami, Qiliang Cai and Erle S. Robertson.** Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 3C Facilitates G1-S Transition by Stabilizing and Enhancing the Function of Cyclin D1. *PLoS Pathog.* 2011, Feb. 7(2): e1001275.

178. Cyclin D1 Is a Bona Fide Target Gene of NFATc1 and Is Sufficient in the Mediation of Injury-induced Vascular Wall Remodeling. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 2010, VOL. 285, NO. 5, pp. 3510–3523, January 29.

179. **Pan Li, Yan Liu, Bing Yi, Guokun Wang, Xiaohua You, Xianxian Zhao, Ross Summer, Yongwen Qin and Jianxin Sun.** MicroRNA-638 is highly expressed in human vascular smooth muscle cells and inhibits PDGF-BB-induced cell proliferation and migration through targeting orphan nuclear receptor NOR1. *Cardiovasc Res.* 2013, Jul 1; 99(1): 185–193. .
180. **Li Li, Hui-Na Zhang, Hou-Zao Chen, Peng Gao, Li-Hua Zhu, Hong-Liang Li, Xiang Lv, Qing-Jun Zhang, Ran Zhang, Zhao Wang, Zhi-Gang She, Ran Zhang, Yu-Sheng Wei, Guan-Hua Du, De-Pei Liu, Chih-Chuan Liang.** SIRT1 Acts as a Modulator of Neointima Formation Following Vascular Injury in Mice. *Circulation Research.* 2011, 108:1180-1189.
181. **Li B, Yang L, Shen J, Wang C, Jiang Z.** The antiproliferative effect of sildenafil on pulmonary artery smooth muscle cells is mediated via upregulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and degradation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation. *Anesth Analg.* 2007, Oct;105(4):1034-41.
182. **Gartel AL, Radhakrishnan SK.** Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. *Cancer Res.* 2005, May 15;65(10):3980-5.
183. **Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L.** *Biochemie.* Heidelberg : Spektrum Verlag, 6. Auflage 2007. 978-3-8274-1800-5.
184. **Alberts B, Johnson A, Walter P, Lewis J, Raff M, Roberts K.** *Molecular Biology of the Cell.* s.l. : Taylor & Francis, 5. Auflage 2007. 978-0815341062.
185. **Seger R, Krebs EG.** The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* 1995, Jun;9(9):726-35. PMID:7601337.
186. **Garnett, M.J. & Marais, R.** Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell.* 2004, Bd. 6, S. 313-319. PMID 15488754.
187. **Koh Kawasaki, Robert S. Smith Jr., Chung-Ming Hsieh, Jianxin Sun, Julie Chao and James K. Liao.** Activation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Protein Kinase Akt Pathway Mediates Nitric Oxide-Induced Endothelial Cell Migration and Angiogenesis. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY.* 2003, Aug. 2003, p. 5726–5737.
188. **Jackson G, Benjamin N, Jackson N, Allen MJ.** Effects of sildenafil citrate on human hemodynamics. *Am J Cardiol.* 1999, 83:13C–20C.
189. **Madhani M, Okorie M, Hobbs AJ, MacAllister RJ.** Reciprocal regulation of human soluble and particulate guanylate cyclases in vivo. *Br J Pharmacol.* 2006, 149: 797–801.

190. **Klinger JR, Thaker S, Houtchens J, Preston IR, Hill NS, Farber HW.** Pulmonary hemodynamic responses to brain natriuretic peptide and sildenafil in patients with pulmonary arterial hypertension. *Chest*. 2006, 129: 417–425.
191. **Baliga RS, Zhao L, Madhani M, Lopez-Torondel B, Visintin C, Selwood D et al.** Synergy between natriuretic peptides and phosphodiesterase 5 inhibitors ameliorates pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008, 178: 861–869.
192. **Galie N, Ghofrani HA, Torbicki A, et al.** Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*. 2005, 353: 2148–2157.
193. **Galie N, Manes A, Negro L, Palazzini M, Bacchi-Reggiani ML, Branzi A.** A meta-analysis of randomized controlled trials in pulmonary arterial hypertension. *Eur Heart J*. 2009, 30: 394–403.
194. **Frey N, Katus HA, Olson EN, Hill JA.** Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? *Circulation*. 2004, 109:1580–1589. [PubMed: 15066961].
195. **Fatkin D, McConnell BK, Mudd JO, Semsarian C, Moskowitz IG, Schoen FJ, Giewat M, Seidman CE, Seidmann JG.** An abnormal Ca(2+) response in mutant sarcomere protein-mediated familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest*. 2000, 106:1351–1359. [PubMed: 11104788].
196. **MP, Gupta.** Factors controlling cardiac myosin-isoform shift during hypertrophy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 2007, 43:388–403. [PubMed: 17720186].
197. **Vanderheyden M, Mullens W, Delrue L, Goethals M, de Bruyne B, Wijns W, Geelen P, Verstreken S, Wellens F, Bartunek J.** Myocardial gene expression in heart failure patients treated with cardiac resynchronization therapy responders versus nonresponders. *J Am Coll Cardiol*. 51:129–136. [PubMed: 18191736].
198. **Lowes BD, Minobe W, Abraham WT, Rizeq MN, Bohlmeier TJ, Quaife RA, Roden RL, Dutcher DL, Robertson AD, Voelkel NF, Badesch DB, Groves BM, Gilbert EM, Bristow MR.** Changes in gene expression in the intact human heart: downregulation of alpha-myosin heavy chain in hypertrophied, failing ventricular myocardium. *J Clin Invest*. 1997, 100:2315–2324. [PubMed:9410910].
199. **Miyata S, Minobe W, Bristow MR, Leinwand LA.** Myosin heavy chain isoform expression in the failing and nonfailing human heart. *Circ Res*. 2000, 86:386–390. [PubMed: 10700442].
200. **Stelzer JE, Brickson SL, Locher MR, Moss RL.** Role of myosin heavy chain composition in the stretch activation response of rat myocardium. *J Physiol*. 2007, 579:161–173. [PubMed: 17138609].

201. **Montgomery RL, Hullinger TG, Semus HM, Dickinson BA, Seto AG, Lynch JM, Stack C, Latimer PA, Olson EN, van Rooij E.** Therapeutic Inhibition of miR-208a Improves Cardiac Function and Survival During Heart Failure. *Circulation*. 2011, October 4; 124(14): 1537–1547. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.030932.
202. **Witte, Dr. med. Felicitas.** BNP (B-Typ Natriuretisches Peptid, Brain Natriuretic Peptide). *Netdoktor.de*. [Online] NetDoktor.de GmbH, Landwehrstraße 60-62, 80336 München. [Zitat vom: 27. Oktober 2013.] <http://www.netdoktor.de/Diagnostik+Behandlungen/Laborwerte/BNP-B-Typ-Natriuretisches-Pep-10988.html>.
203. **Renz-Polster H, Krautzig S, Braun J.** *Basislehrbuch Innere Medizin*. s.l. : Urban & Fischer, 3. Auflage. 978-3-437-44460-9.
204. **Gerrer, Franz.** Medizin Kompakt. [Online] Medizin Kompakt, Hedwigstraße 4, 84518 Garching a. d. Alz. [Zitat vom: 26. Oktober 2014.] <http://www.medizin-kompakt.de/anatomie/herz/endokrine-herzfunktionen>.
205. **Klein M, Schermuly RT, Ellinghaus P, Milting H, Riedl B, Nikolova S et al.** Combined tyrosine and serine/threonine kinase inhibition by sorafenib prevents progression of experimental pulmonary hypertension and myocardial remodeling. *Circulation*. 2008, 118: 2081–2090.
206. **Ghofrani HA, Seeger W, Grimminger F.** Imatinib for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *N Engl J Med*. 2005, 353:1412-1413, DOI: 10.1056/NEJMc051946.
207. **Patterson KC, Weissmann A, Ahmadi T, Farber HW.** Imatinib mesylate in the treatment of refractory idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Ann Intern Med*. 2006, 145: 152–153.
208. **Souza R, Sitbon O, Parent F, Simonneau G, Humbert M.** Long term imatinib treatment in pulmonary arterial hypertension. *Thorax*. 2006, 61: 736.
209. **Tapper EB, Knowles D, Heffron T, Lawrence EC, Csete M.** Portopulmonary hypertension: imatinib as a novel treatment and the Emory experience with this condition. *Transplant Proc*. 2009, 41:1969–1971.
210. **Ten FH, Dumitrescu D, Bovenschulte H, Erdmann E, Rosenkranz S.** Significant improvement of right ventricular function by imatinib mesylate in scleroderma-associated pulmonary arterial hypertension. *Clin Res Cardiol*. 2009, 98: 265–267.
211. **Chhina MK, Nargues W, Grant GM, Nathan SD.** Evaluation of imatinib mesylate in the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Future Cardiol*. 2010, 6: 19–35.

212. **J D Carpten, AL Faber, C Horn, GP Donoho, SL Briggs, CM Robbins, G Hostetter, S Boguslawski, TY Moses, S Savage, M Uhlik, A Lin, J Du, Y-W Qian, DJ Zeckner, G Tucker-Kellogg, J Touchman, K Patel, S Mousses, M Bittner, R Schevitz, M-HT Lai, et. al.** A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature*. 2007, 448, 439-444 (26 July 2007) | doi:10.1038/nature05933.
213. **Marte BM, Downward J.** PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. *Trends Biochem Sci*. 1997, 22:355–358. [PubMed: 9301337].
214. **Manning BD, Cantley LC.** AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell*. 2007, June 29; 129(7): 1261–1274. doi:10.1016/j.cell.2007.06.009.
215. **Ogawa A, Firth AL, Yao W, Madani MM, Kerr KM, Auger WR, Jamieson SW, Thistlethwaite PA, Yuan JX.** Inhibition of mTOR attenuates store-operated Ca²⁺ entry in cells from endarterectomized tissues of patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009, Oct;297(4):L666-76.
216. **Aiko Ogawa, Amy L. Firth, Kimberly A. Smith, Mary V. Maliakal, and Jason X.-J. Yuan.** PDGF enhances store-operated Ca²⁺ entry by upregulating STIM1/Orai1 via activation of Akt/mTOR in human pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012, Jan 15, 302(2): C405–C411. PMCID: PMC3328839.
217. **Yan Zhao, Swarajit K. Biswas, [...], and Lakshman Segar.** PDGF-induced vascular smooth muscle cell proliferation is associated with dysregulation of insulin receptor substrates. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2011, Jun 300(6): C1375-C1385.
218. **Gang Song, Gaoliang Ouyang, Shideng Bao.** The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J. Cell. Mol. Med.* . 2005, Vol 9, No 1, pp. 59-71.
219. **Chen R., Kim O., Yang J., Sato K., Eisenmann K.M., McCarthy J., Chen H., Qiu Y.** Regulation of Akt/PKB activation by tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem*. 2001, 276:31858-31862.
220. **Sable C.L., Filippa N., Hemmings B., Van Obberghen E.** cAMP stimulates protein kinase B in a Wortmannin-insensitive manner. *FEBS. Lett*. 1997, 409: 253-257.
221. **Esther Millette, Bernhard H. Rauch, Richard D. Kenagy, Guenther Daum, Alexander W. Clowes.** Platelet-Derived Growth Factor–BB Transactivates the Fibroblast Growth Factor Receptor to Induce Proliferation in Human Smooth Muscle Cells. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 2003, Volume 16, Issue 1, Pages 25–28, January.

222. **Bhola K Dahal, Djuro Kosanovic, [...], and Ralph T Schermuly.** Involvement of mast cells in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Respir Res.* 2011, 12(1): 60. PMCID: PMC3104382.
223. **Kerkela R, Grazette L, Yacobi R, Iliescu C, Patten R, Beahm C et al.** Cardiotoxicity of the cancer therapeutic agent imatinib mesylate. *Nat Med* . 2006, 12: 908–916.
224. **Schermuly RT, Weissmann N, Enke B, Ghofrani HA, Forssmann WG, Grimminger F et al.** Urodilatin, a natriuretic peptide stimulating particulate guanylate cyclase, and the phosphodiesterase 5 inhibitor dipyridamole attenuate exp. PAH: synergism upon coapplication. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001, 25: 219–225.
225. **Stiebellehner L, Petkov V, Vonbank K, Funk G, Schenk P, Ziesche R et al.** Long-term treatment with oral sildenafil in addition to continuous IV epoprostenol in patients with pulmonary arterial hypertension. *Chest* . 2003, 123: 1293–1295.
226. **Stocker C, Penny DJ, Brizard CP, Cochrane AD, Soto R, Shekerdemian LS.** Intravenous sildenafil and inhaled nitric oxide: a randomised trial in infants after cardiac surgery. *Intensive Care Med.* 2003, 29: 1996–2003.
227. **Humbert M, Barst RJ, Robbins IM, Channick RN, Galie N, Boonstra A et al.** Combination of bosentan with epoprostenol in pulmonary arterial hypertension: BREATHE-2. *Eur Respir J* . 2004, 24: 353–359.
228. **Hoeper MM, Faulenbach C, Golpon H, Winkler J, Welte T, Niedermeyer J.** Combination therapy with bosentan and sildenafil in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J.* 2004, 24: 1007–1010.
229. **Pascale C. van Weeren, Kim M. T. de Bruyn, Alida M. M. de Vries-Smits, Johan van Lint and Boudewijn M. Th. Burgering.** Essential Role for Protein Kinase B (PKB) in Insulin-induced Glycogen Synthase Kinase 3 Inactivation. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY.* 1998, Vol. 273, No. 21, Issue of May 22, pp. 13150–13156.
230. **Grimes CA, Joep RS.** The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3 β in cellular signaling. *Prog Neurobiol.* 2001, Nov;65(4):391-426.
231. **Woodgett, Bradley W. Doble and James R.** GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *Journal of Cell Science.* 2003, 116, 1175-1186.

232. **Piotr Sklepkiwicz, Ralph Theo Schermuly, Xia Tian, Hossein Ardeschir Ghofrani, Norbert Weissmann, Daniel Sedding, Tarek Kashour, Werner Seeger, Friedrich Grimminger, Soni Savai Pullamsetti.** Glycogen Synthase Kinase 3beta Contributes to Proliferation of Arterial Smooth Muscle Cells in Pulmonary Hypertension. *PLoS ONE*. 2011, April, Volume 6, Issue 4, e18883.
233. **Cooper, Marianna Pap and Geoffrey M.** Role of Glycogen Synthase Kinase-3 in the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Cell Survival Pathway. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 1996, Vol. 273, No. 32, Issue of August 7, pp. 19929–19932.
234. **Shakoori A, Ougolkov A, Yu ZW, Zhang B, Modarressi MH, Billadeau DD, Mai M, Takahashi Y, Minamoto T.** Deregulated GSK3beta activity in colorectal cancer: its association with tumor cell survival and proliferation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005, Sep 9;334(4):1365–73.
235. **Xiaohong Wang, Yan Xiao, Yongshan Mou, Ying Zhao, W. Matthijs Blankesteyn and Jennifer L. Hall.** A Role for the β -Catenin/T-Cell Factor Signaling Cascade in Vascular Remodeling. *Circ Res*. 2002, 90:340–347.
236. **Rudarakanchana N, et al.** Functional analysis of bone morphogenetic protein type II receptor mutations underlying primary pulmonary hypertension. *Hum Mol Genet*. 2002, 11(13):1517–1525.
237. **Nohe A, et al.** The mode of bone morphogenetic protein (BMP) receptor oligomerization determines different BMP-2 signaling pathways. *J Biol Chem*. 2002, 277(7):5330–5338.
238. **Grijelmo C, et al.** Proinvasive activity of BMP-7 through SMAD4/src-independent and ERK/Rac/JNK-dependent signaling pathways in colon cancer cells. *Cell Signal*. 2007, 19(8):1722–1732.
239. **Tian Q, He XC, Hood L, Li L.** Bridging the BMP and Wnt pathways by PI3 kinase/Akt and 14-3-3zeta. *Cell Cycle*. 2005, 4(2):215–216.
240. **Galetto R, Albajar M, Polanco JI, Zakin MM, Rodríguez-Rey JC.** Identification of a peroxisome-proliferator-activated-receptor response element in the apolipoprotein E gene control region. *Biochem J*. 2001, Jul 15; 357(Pt 2):521–7.
241. **Georg Hansmann, Vinicio A. de Jesus Perez, Tero-Pekka Alastalo, Cristina M. Alvira, Christophe Guignabert, Janine M. Bekker, Stefan Schellong, Takashi Urashima, Lingli Wang, Nicholas W. Morrell and Marlene Rabinovitch.** An antiproliferative BMP-2/PPAR γ /apoE axis in human and murine SMCs and its role in pulmonary hypertension. *J Clin Invest*. 2008, May 1; 118(5): 1846–1857. .

242. **Gilde A.J., Fruchart J.C., Staels B.** Peroxisome proliferator-activated receptors at the crossroads of obesity, diabetes, and cardiovascular disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2006, 48:A24–A32. doi: 10.1016/j.jacc.2006.04.097.
243. **Benkirane K, Amiri F, Diep QN, El Mabrouk M, Schiffrin EL.** PPAR-gamma inhibits ANG II-induced cell growth via SHIP2 and 4E-BP1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006, Jan; 290(1):H390-7.
244. **Wakino S, Kintscher U, Liu Z, Kim S, Yin F, Ohba M, Kuroki T, Schönthal AH, Hsueh WA, Law RE.** Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit mitogenic induction of p21(Cip1) by modulating the protein kinase Cdelta pathway in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2001, Dec 14; 276(50):47650-7.
245. **Marx N, Duez H, Fruchart JC, Staels B.** Peroxisome proliferator-activated receptors and atherogenesis: regulators of gene expression in vascular cells. *Circ Res.* 2004, May 14; 94(9):1168-78.
246. **Goetze S, Xi XP, Kawano H, Gotlibowski T, Fleck E, Hsueh WA, Law RE.** PPAR gamma-ligands inhibit migration mediated by multiple chemoattractants in vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1999, May;33(5):798-806.
- 247.

11. Index

„peroxisome proliferator-activated receptor- γ“ (PPARγ).....	91
8-Br-cGMP	77
8-pCPT-cGMP.....	77
ACVR2A und ACVR2B.....	18
AKT (Proteinkinase B).....	84
Aktin-Filamentsystem.....	23
Aktivin receptor like Kinases (ALK).....	18
Alveolen.....	2
Ambrisentan.....	12
Antikörperhybridisierung	42
Apoptose	9
Arterie.....	5
Arteriole.....	6
atriales Natriuretisches Peptid (ANP).....	81
äußere Atmung.....	2
Basalmembran.....	5
BCR-ABL	25
Betaglycan (TGFβR3)	19
Blotting	42
BMP Liganden.....	18
BMP3	18
Bone Morphogenetic Proteins“ (Knochenmorphogenetische Proteine, BMPs	16
cDNA Synthese	46
cGMP-abhängige Kinase I (cGMP-dependent kinase I, cGKI)	21
cGMP-abhängige Proteinkinase 1 (cGKI, PKG)	77
Chemotaxis.....	23
Chordin	18
chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD).....	11
c-kit.....	25
<i>Cor pulmonale</i>	8
<i>Crotalaria spectabilis</i>	16
Cycline, Cyclin D1.....	78
cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) ..	11
cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) ...	12
<i>de novo</i> Muskularisierung	9
Dehydromonocrotalin	16
Diastole.....	4
Echokardiographie.....	9
Endoglin (CD105).....	19
Endothel	5, 9
Endothelin-1 (ET-1).....	12
Endothelzellen (ECs).....	9
Epoprostenol	12
ERK1/ERK2-Kaskade	79
Flt3	25
Follistatin	18
Wachstums- und Differenzierungsfaktoren („Growth and Differentiation Factors“	18
Gefäßwiderstand	9
Gelelektrophorese	42
GIST.....	25
Glycogen Synthase Kinase-3 beta (GSK3β) ...	89
Guanosinmonophosphat (cGMP)	22
Guanosintriphosphat (GTP)	22
HeLa	15
heterotetramerischer Komplex	18
Histologische Färbungen	48
Hypertrophie.....	8
idiopathische pulmonale Hypertonie	8
Iloprost.....	12
Imatinib (Gleevec).....	14
Inhibin	19
Inhibitor des DNA-bindenden Proteins I (Inhibitor of DNA binding Protein I, ID1) ..	23
Inhibitor of DNA binding Protein (ID1, ID2, ID3)	88
innere Atmung.....	2
Isolation von Ribonukleinsäuren	45
Kapillargefäß.....	7
Kinase.....	79
kontraktile Dysfunktion	10
Körperkreislauf	4
<i>Lamina elastica externa</i>	6
<i>lamina elastica interna</i>	5
Lobus, Loben.....	3
lösliche Guanylatzyklase (soluble guanylate cyclase, sGC)	14
Lungenarterie	4
Lungenfibrose	11
Lungenkreislauf.....	4
Macitentan.....	14
MAP- (mitogen-activated protein) Kinase- Signalweg.....	79
MCT-Rattenmodell	15
Migrationsassay.....	47
Mikrozirkulation	7
Mitogen-activated protein kinase kinase (MAP2K).....	79
Monocrotalin (MCT)	23, 80

negative Rückkopplungsschleife (feedback loop)	20	Schistosomiasis	11
Noggin	18	Scratch-Assay	<i>Migrationsassay</i>
NO-Synthasen (NOS), „endothelial“ NOS (eNOS), „inducible“ NOS (iNOS) und „neuronal“ NOS	21	sechs-Minuten-Gehtest (6 minute walk Test, 6-MWD)	13
Nucleus	20	Selexipag	14
Oxygenierung	4	Sequestrierung	19
p21 (Cyclin-abhängige Kinaseinhibitor)	78	Serinrest 9 (S9)	89
PDE5	12	Sildenafil	13
PDGF-Signalweg	24	Simian sarcoma Virus (SSV)	23
Philadelphia-Chromosom-positive Leukämie	25	SMAD binding elements (SBE)	20
Phosphatase	79	SMAD ubiquitin ligase 1 (SMURF1)	19
Phosphodiesterase (PDE)	12	SMAD1, SMAD5 und SMAD8	18
platelet-derived growth factor (PDGF)	14	SMAD1/5/8-Phosphorylierung	90
Pleura	3	SMAD2 und SMAD3	18
Primer designing	44	SMAD4	20
Proliferationsassay	46	Stickstoffmonoxid (NO)	12, 21
Prostacyclin (PGI ₂)	11	Stripping	43
Prostanoide	11	Systole	4
Proteinkinase B (AKT)	84	Tail-Domain (TD)	18
<u>Pulmonal arterielle Hypertonie (PAH)</u>	8	Taladafil	13
pulmonalarterielle weiche Muskelzellen (PASCs)	9	Thyminininkorporationsassay	<i>Proliferationsassay</i>
pulmonal-arterieller Mitteldruck (PAPm)	7	Transforming growth factor β (Transformierender Wachstumsfaktor, TGF- β)	16
Pulmonale Hypertonie	7	Treprostinil	12
pulmonal-vaskuläre Läsionen	9	<i>Tunica externa</i>	5
pulmonalvaskuläres Remodeling	9	<i>Tunica interna</i>	5
Pyrrolizidinalkaloid	80	<i>Tunica media</i>	5
rapidly accelerated fibrosarcoma	79	Tyrosinrest 216 (Y216)	89
rat fibrosarcoma <i>Siehe</i> rapidly accelerated fibrosarcoma	46	Vasodilatation	6
Real-Time-PCR	46	vasodilatorische Kapazität	9
Rechtsherzkatheterisierung	9	Vasokonstriktion	6
rechtsventrikuläre Hypertrophie (RVH)	10	Vasokonstriktor	12
respiratorisches Epithel	2	Vene	5
rezeptoraktivierte SMADs (R-SMADs)	18	Wachstumsfaktoren	11
Riociguat	14	Western Blot	42
Rosiglitazon	91	Zellproliferation	9
Säure-Base-Regulation	4	Zellsplitting	41
		Zytochrom-P450-Monooxygenasen	16

12. Danksagung

Zum Abschluß möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich in den letzten Jahren bei dieser Arbeit unterstützt und zu zum Gelingen beigetragen haben:

Bei Herrn Prof. Dr. Ralph Schermuly für die für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, für die stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, sowie für die Betreuung und Begutachtung dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Adriaan Dorresteijn für die Betreuung, Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und die Begutachtung dieser Arbeit.

Bei Frau Prof. Dr. Tina Trenczek und Herrn Prof. Dr. Ardeshir Ghofrani für die Bewertung meiner Disputation.

Bei Frau Dr. Soni Pullamsetti für die Betreuung dieser Arbeit, die Geduld, Hilfe und die Begutachtung dieser Arbeit.

Die Durchführung eines Projekts ist ohne Freunde und Kollegen möglich. Doch ohne die Hilfe meiner "Labmates" wäre es mit Sicherheit ein um einiges längerer und schwierigerer Weg bis zum Abschluß dieser Arbeit gewesen. Daher gilt mein Dank auch:

Stephanie Viehman für die vielen Tausend kleinen Gefallen, die mir viele Stunden an Arbeit erspart haben, sowie für die stete Hilfsbereitschaft und die moralische Unterstützung.

Dr. Xia Tian für die stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft, hilfreiche Tipps und insbesondere das Beantworten der vielen kleinen Fragen, die sich während dieser Arbeit gestellt haben.

Frau Gayathri Viswanathan, Frau Zaneta Sibinska, Herrn Anuar Kalymbetov, Frau Carolin Merkel und Frau Stanka Mihaylova für die gute Teamarbeit, Unterstützung und gegenseitige Hilfsbereitschaft.

Herrn Hamza Al-Tamari, Frau Anja Schmall, Frau Katharina Weidl, Herrn Dr. Rajkumar Savai, Herrn Matthäus Majewski, Herrn Damian Krompiec, Frau Elisa Freitag für die Schaffung einer kollegialen, hilfsbereiten und angenehme Arbeitsatmosphäre.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Freunden Jana Nowinski, Benjamin Lotz, Sandra Hennig, Kevin Kraft, Nicolas Andrew Peter Maguire, Claus Stadelmann, Frithjof Metzner und Frau Dr. Silke Frankenberg für das Korrekturlesen bedanken.

Zu guter letzt gilt mein allergrößter Dank meinen Eltern, die mich seit jeher mit all Ihrer Kraft unterstützt haben und dazu ermutigt haben, immer mein bestes zu geben, sowie meinen beiden Brüdern Alexander und Mathias. Ich danke auch meiner lieben Svenja, die mir immer zur Seite gestanden und mir mit ihrer Liebe den Rückhalt gegeben hat, alle Hindernisse zu überwinden.